

Immunologische Analyse der postakuten Entzündungsphase einer *Klebsiella pneumoniae* induzierten Pneumonie unter dem Einsatz von prospektiv definierten mesenchymalen Stammzellen zur experimentellen Therapie

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Vorgelegt von Krug, Philipp Axel
aus
Karlsruhe

Gießen 2017

Aus dem Institut für klinische Immunologie und Transfusionsmedizin unter der Leitung
von Prof. Dr. Gregor Bein
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. Holger Hackstein
Gutachter: Prof. Dr. Trinad Chakraborty

Tag der Disputation: 23.01.2017

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Mesenchymale Stammzellen.....	1
1.2	Bakterielle Lungenentzündung	8
1.3	Dendritische Zellen in der Lunge.....	12
1.4	Fragestellung	13
2	Material und Methoden.....	15
2.1	Materialien	15
2.2	Methoden	20
3	Ergebnisse	34
3.1	Analyse der verwendeten MSCs	34
3.2	Analyse der bronchoalveolären Lavage.....	35
3.3	Analyse der Zellpopulationen in der bronchoalveolären Lavage.....	37
3.4	Analyse des Lungenhomogenats	38
3.5	Analyse der lymphozytären Populationen in der Lunge	42
3.6	Analyse der Zytokinproduktion der T- Zellen	45
3.7	Analyse der Bindung von Annexin-V zur Bestimmung der Vitalität verschiedener Zelltypen.....	51
4	Diskussion.....	54
4.1	Verwendung von prospektiv definierten MSCs	54
4.2	Wirkprinzipien der MSCs während einer Pneumonie.....	54
4.3	Untersuchung der bronchoalveolären Lavage	55
4.4	Untersuchung des Lungenhomogenats.....	57
4.5	Vergleich der Auswirkungen von MSCs in der akuten und postakuten Phase der Klebsiella Pneumonie	59
4.6	Ausblick.....	61
5	Zusammenfassung.....	62
6	Summary.....	64
7	Anhang.....	66
7.1	Abkürzungsverzeichnis	66
7.2	Abbildungsverzeichnis.....	67
7.3	Tabellenverzeichnis.....	68
7.4	Literaturverzeichnis	68
8	Publikationen.....	75
9	Danksagung.....	75

10	Erklärung zur Dissertation.....	76
----	---------------------------------	----

1 Einleitung

1.1 Mesenchymale Stammzellen

Mesenchymale Stammzellen (MSCs) finden sich beim Menschen vor allem im Knochenmark. Zu geringeren Anteilen wurden sie allerdings auch in anderen Geweben nachgewiesen, wie zum Beispiel in der Plazenta (Igura et al. 2004), im Skelettmuskel (Gao et al. 2014), in der Lunge (Lama et al. 2007) und im Fettgewebe (Zuk et al. 2001). Die Gewinnung embryonaler Stammzellen gestaltet sich problematisch, da diese aus Embryonen vor der Gastrulation, also der Aufteilung des Embryoblasten in die drei Keimblätter Entoderm, Mesoderm und Ektoderm, gewonnen werden müssen (Ganten et al. 2008). Im Gegensatz dazu können adulte Stammzellen wie die MSCs auch bei Erwachsenen aus verschiedenen Geweben des Körpers extrahiert werden (Muñiz et al. 2015). Hierbei ist die Aspiration von Knochenmark aus dem Beckenkamm etabliert (Narbona-Carceles et al. 2014). Die Verwendung adulter Stammzellen zu Forschungszwecken gestaltet sich deshalb aus ethischen Gesichtspunkten weniger kritisch.

1.1.1 Charakteristika der Stammzelle

Im Gegensatz zu totipotenten embryonalen Stammzellen, die sich in alle Zelltypen differenzieren können, sind MSCs multipotent (Muñiz et al. 2015). Dies bedeutet, dass sich aus ihnen nur bestimmte Zelltypen entwickeln können. Abhängig von den Kulturbedingungen können sich MSCs in Muskel-, Knorpel-, Sehnen-, Knochen-, Fett- oder Bindegewebszellen differenzieren. Andere Beispiele für multipotente Stammzellen sind hämatopoetische Stammzellen, aus denen das myelotische und lymphatische System entstehen, sowie epitheliale oder neuronale Stammzellen (Hoffbrand 2003). Ferner wird diskutiert, ob unter bestimmten Bedingungen auch eine Differenzierung von MSCs in andere Zelltypen wie neuronale, Herzmuskel-, oder Leberzellen möglich ist. Des Weiteren verfügen MSCs über die Fähigkeit der asymmetrischen Zellteilung. Hierbei entstehen während eines Teilungsvorgangs eine weiter differenzierte Zelle und eine MSC mit allen Fähigkeiten der Mutterzelle (Barry 2003; Bruder et al. 1994) .

1.1.2 Prospektiv definierte MSCs

Die Plastikadhärenz der MSCs wird häufig genutzt, um sie von den anderen Zellen des Knochenmarks zu trennen. Die so gewonnene Population beinhaltet jedoch immer noch andere Zellen, wie Fibroblasten und hämatopoetische Stammzellen. Eine

Verunreinigung solcher Kulturen entsteht außerdem durch Zellen mit beginnender Differenzierung, die zwar noch plastikadhärent sind, aber ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung schon verloren haben. Auf Grund dieser wenig genauen Definition zeigen verschiedene Zelllinien von MSCs unterschiedliche Expressionsmuster von Zytokinen oder Oberflächenmarkern (Dominici et al. 2006; Sensebé et al. 2013). Da lange Zeit keine spezifischen Oberflächenmarker für MSCs bekannt waren, wurden sie anhand dreier Kriterien definiert: Erstens anhand ihrer zur Kultivierung verwendeten Plastikadhärenz, zweitens ihrer Fähigkeit zur asymmetrischen Teilung und drittens anhand ihrer Differenzierbarkeit in Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten (Muñiz et al. 2015; Mabuchi et al. 2013). 2006 wurde die Definition der MSCs durch Dominici et al. durch das Oberflächenprofil CD105⁺, CD73⁺, CD90⁺, CD45⁻, CD34⁻, CD14⁻, CD11b⁻, CD79α⁻, CD19⁻, HLA-DR⁻ ergänzt (Dominici et al. 2006). Morikawa et al. revolutionierten 2009 die Identifikation von murinen MSCs durch vier Oberflächenmarker: Zunächst wurden durch Durchflusszytometrie alle CD45⁺ und TER119⁺ Zellen aussortiert, dann dienten *platelet-derived growth factor receptor α* (PDGFRα bzw. CD140a) und *stem cells antigen-1* (Sca-1) zur Identifizierung der MSCs (Morikawa et al. 2009). Die so entstandene Kultur war frei von zellulären Kontaminationen und auf Grund des exakt definierten Oberflächenprofils weltweit vergleichbar. Morikawa et al. legten zudem weitere Konsensmarker fest, die auch zur Identifizierung von MSCs in vivo zurate gezogen werden. Hierbei handelt es sich um folgendes Oberflächenprofil: CD29⁺, CD49e⁺, CD105⁺, CD133⁺, PDGFRβ⁺, Flk-1⁺, *vascular endothelial growth factor 3* (VEGFR3⁺), c-kit⁻, CD150⁻ (Morikawa et al. 2009). Die in der Arbeit zugrunde liegenden Studie verwendeten MSCs wurden in Anlehnung an das Protokoll von Morikawa et al. isoliert. Hierdurch wurde die Qualität der Kultivierung im Vergleich zu plastikadhärenten Kulturen erheblich verbessert.

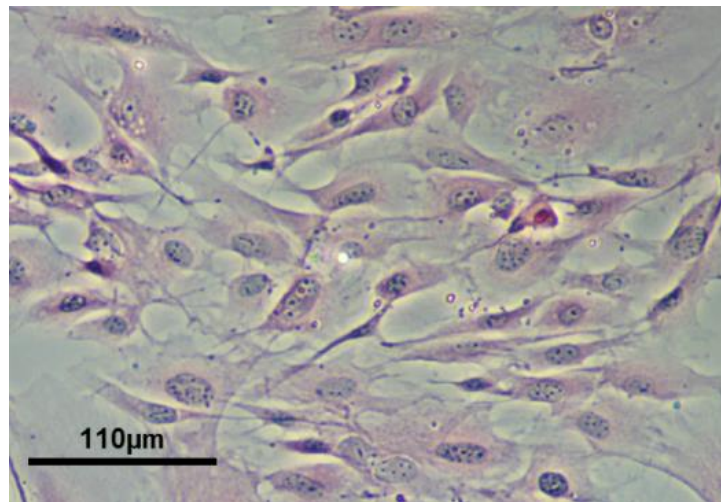


Abbildung 1: Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung von murinen MSCs in Zellkultur
Darstellung von murinen MSCs in Zellkultur in einer HE- Färbung

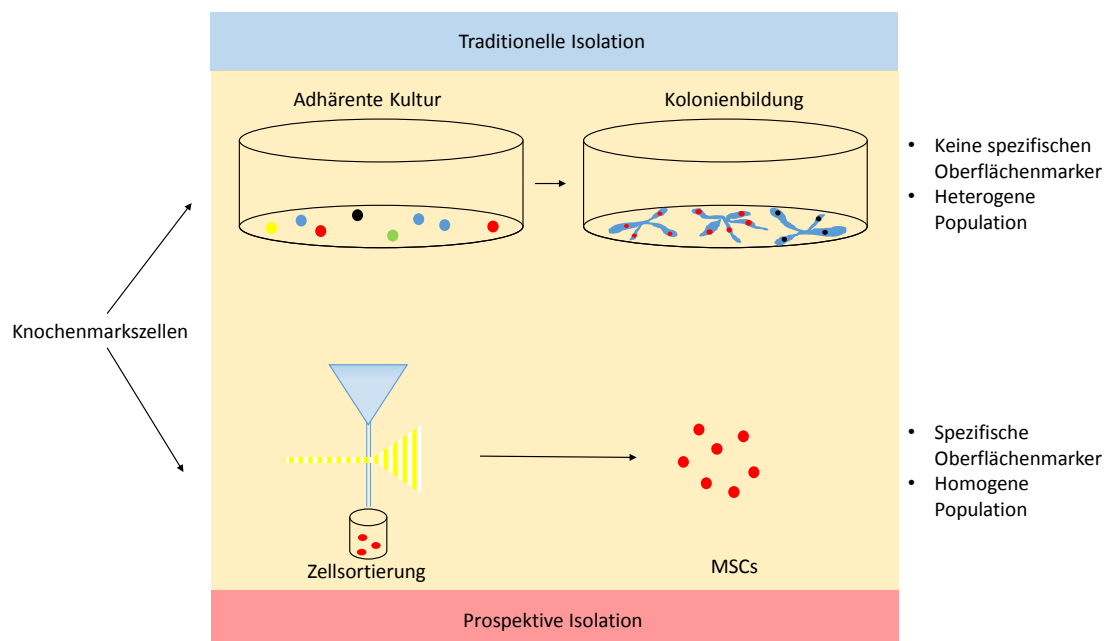


Abbildung 2: Kultivierung von MSCs

Darstellung der verschiedenen Möglichkeiten der Kultivierung von MSCs. In der oberen Bildhälfte ist die klassische Kultivierung nach Adhärenz, in der unteren Bildhälfte die prospektive Sortierung der MSCs und anschließende Kultivierung der MSCs dargestellt. In den Versuchen für diese Dissertation wurde das in der unteren Bildhälfte abgebildete Verfahren verwendet und so eine sehr reine MSC- Kultur erreicht
Abbildung modifiziert nach Mabuchi et al. 2013 (Creative Commons Attribution License)

1.1.2.1 Therapeutische Aspekte der MSCs

Intravenös applizierte oder transplantierte MSCs besitzen die Fähigkeit gezielt in verletztes Gewebe zu migrieren und dort Heilungsprozesse zu unterstützen (Dreger et al. 2014). Dies ist eine klinisch häufig genutzte Fähigkeit der MSCs. Ein Beispiel hierfür ist die Ansiedelung in untergegangenen Herzmuskelgewebe nach einem Herzinfarkt (Mu et al. 2016; Hare et al. 2009) oder die Erneuerung von Meniskus- und Knorpelgewebe nach intraartikulärer Applikation ins Kniegelenk (Murphy et al. 2002). Dieses Phänomen wird als *homing* bezeichnet. Das Chemokin *stromal cell-derived factor-1* (SDF-1) spielt eine entscheidende Rolle bei diesem Prozess (Marquez-Curtis et al. 2013). Dieses Verfahren wird nicht nur wegen der gewebeerneuernden Fähigkeiten der MSCs genutzt, sondern auch die Möglichkeit auf diesem Wege Therapeutika gezielt zum Zielgewebe zu transportieren findet immer mehr Anwendung (Loebinger et al. 2009a). Loebinger et al. zeigten, dass das *homing* von zuvor markierten MSCs zur Suche von Metastasen genutzt werden kann (Loebinger et al. 2009b). Die applizierten MSCs wurden bei diesem Verfahren zuvor modifiziert, sodass sie *tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL) produzieren. TRAIL initiiert den extrinsischen Weg der Apoptose und gehört zur Familie der Tumornekrosefaktoren (TNF). Während TNF sowohl Tumorzellen, als auch gesunde Zellen schädigt, wirkt TRAIL selektiv an maligne entarteten Zellen und hat somit bessere Voraussetzungen für eine therapeutische Verwendung (Ashkenazi et al. 1999). Jedoch hat TRAIL eine kurze Halbwertszeit und benötigt hohe Konzentrationen am Wirkort, was seinen therapeutischen Einsatz kompliziert (Ashkenazi et al. 1999). Durch die Verwendung modifizierter MSCs, die TRAIL freisetzen können, haben Loebinger et al. eine Möglichkeit geschaffen nicht nur gezielt zu therapieren, sondern auch den pharmakokinetischen Problemen beim Einsatz von TRAIL zu begegnen. So waren sie in der Lage im Lungenmetastasen-Mausmodell gezielt die Apoptose der Tumorzellen zu induzieren (Lobsien et al. 2013; Loebinger et al. 2009a; Loebinger et al. 2009b).

Die Arbeitsgruppe um Li stellten anhand eines Mausmodells fest, dass MSCs eine positive Wirkung auf den Verlauf einer Transplantation von Nabelschnurblut haben (Li et al. 2014). In der Studie wurde nicht nur die hämatopoetische Regenerationszeit durch die Gabe von MSCs verkürzt, sondern auch das Auftreten einer akuten *graft versus host disease* (GVHD) vermindert. Dies wird zum einen auf die immunregulatorische Wirkung der MSCs zurückgeführt. Zum anderen exprimieren MSCs hämatopoetische Wachstumsfaktoren, Adhäsionsmoleküle und Faktoren wie zum Beispiel CXCR-4, die das *homing* der hämatopoetischen Stammzellen anregen.

Zudem unterbinden MSCs die proliferative T-Zellantwort, die hauptverantwortlich für die Entstehung der GVHD ist (Li et al. 2014).

Bei der humanen Anwendung kam es bisher zu uneinheitlichen Ergebnissen bezüglich der Wirksamkeit von MSCs bei steroidrefraktärer GVHD. Mehrere Phase II Studien zeigten Erfolge in der Therapie der akuten GVHD unter Verwendung von MSCs (Wada et al. 2013). Zwei Phase III Studien konnten dieses Ergebnis jedoch nicht bestätigen, da sie keine positiven Ergebnisse erhielten. Folglich zeigt sich hier der Bedarf an weiteren Studien, um die therapeutische Wirksamkeit einer MSC-Applikation gegen die GVHD zu bestätigen (Michael et al. 2013; Wolf et al. 2012).

Ein weiteres therapeutisches Feld für die Anwendung der MSCs stellt die Behandlung der Multiplen Sklerose (MS) dar, bei der bereits einige Erfolge erzielt werden konnten. Lajimi et al. verglichen in einem aktuellen Review mehr als 20 Studien über die Verwendung von MSCs bei MS. Sie kommen zu dem Ergebnis, dass die Therapie als sicher und durchführbar einzustufen sei (Lajimi et al. 2013).

Für andere Autoimmunerkrankungen wie Lupus erythematodes oder Morbus Crohn gibt es vielversprechende therapeutische Ansätze mit MSCs. Erfolgreiche Fallberichte und Pilotstudien mit kleinen Patientenzahlen zeigten hier stark schwankende Erfolge und fordern somit auch auf diesem Gebiet größere prospektiv randomisierte Studien um Aussagen im Sinne der evidenzbasierten Medizin treffen zu können (Wada et al. 2013).

1.1.3 Immunmodulation durch MSCs

Obwohl das immunmodulatorische Potential von MSCs längst erkannt wurde und in vielen klinischen Ansätzen genutzt wird, ist die Forschungslage uneinheitlich bezüglich des immunologischen Verhaltens der MSCs (Krampera et al. 2013). Diskutiert werden immunsuppressive wie auch stimulierende Aspekte, die in den folgenden Abschnitten näher beleuchtet werden.

1.1.3.1 Immunsuppressive Aspekte der Immunmodulation

Die immunregulatorischen Wirkungen der MSCs sind breit gefächert. Sie greifen zum einen in die Aktivierung und Proliferation verschiedener immunologischer Zellen ein. Zum anderen schaffen sie durch eine Beeinflussung der Zytokinproduktion ein antiinflammatorisches Milieu (El-Jawhari et al. 2014).

MSCs inhibieren die Proliferation von T-Zellen (Di Nicola 2002; Bartholomew et al. 2002). Diese Erkenntnis wurde seitdem für CD4⁺- und CD8⁺ T-Zellen mehrfach bestätigt und die Studienlage in einem Review von Duffy et al. 2011 zusammengetragen (Duffy et al. 2011). bei dieser Inhibition spielen viele verschiedene sowohl lösliche als auch direkt Zell- Zellkontakt vermittelte Faktoren eine Rolle (Duffy et al. 2011).

Dementgegen begünstigen MSCs die Entwicklung von regulatorischen T-Zellen und deren immunregulatorische Wirkung. Regulatorische T-Zellen reduzieren die T-Zell Antwort und sind somit wichtig um überschießende Immunantworten zu verhindern (Duffy et al. 2011). Dies geschieht größtenteils über lösliche Faktoren, jedoch auch über Zell-Zellkontakte. Entscheidend ist hierbei die Expression von PD-1 und PD-2 (*programmed cell death*), die an die entsprechenden Liganden auf T- und B-Zellen binden und so deren Apoptose initiieren (Augello et al. 2005). Auch Luz-Crawford et al. belegen diese Wirkung in Experimenten an Th17- und Th1-Zellen: Die Differenzierung von Th1, sowie Th17-Zellen wurde durch die Anwesenheit von MSCs unterdrückt. Dieser Effekt blieb unter Verwendung einer Zellbarriere bestehen und legt so eine Vermittlung über lösliche Faktoren nahe. Jedoch war zur Suppression der Interleukin 17 (IL-17) Produktion durch Th17-Zellen ein direkter Zell-Zell-Kontakt der MSCs notwendig. Hier wurde PD-1 als Ursache für die Suppression der Funktion identifiziert (Luz-Crawford et al. 2012). Auch die gesteigerte Transkription von T-regulatorischen Genen ist Zell-Zellkontakt vermittelt (Prevosto et al. 2007; Ghannam et al. 2010). In einer weiteren Arbeit stellten Luz-Crawford et al. fest, dass MSCs in der Lage seien auch unter proinflammatorischen Bedingungen die Differenzierung von aktivierten T-Zellen zu Th1 und Th17-Zellen zu supprimieren und im gleichen Zug die Differenzierung in regulatorische CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Zellen zu fördern (Luz-Crawford et al. 2013).

Ein weiterer Effekt der MSCs ist die Reduktion der Zytokinproduktion von IL-2 und TNF- α in T-Zellen (Eljaafari et al. 2012). Weitere immunregulierende Faktoren der MSCs sind zum Beispiel die Sekretion von Indolamin-2,3-Dioxygenase, die in die Proteinsynthese eingreift. Dies betrifft bei der Immunantwort in besonderem Maße die schnell proliferierenden T-Lymphozyten (Meisel et al. 2004; Eljaafari et al. 2012). Auch B-Zellen werden in ihrer Funktion durch MSCs eingeschränkt. So wurde festgestellt, dass durch die Anwesenheit von MSCs sowohl die Proliferation der B-Zellen, ihre Produktion von Antikörpern als auch die Fähigkeit zur Chemotaxis reduziert werden (Corcione et al. 2006).

MSCs reduzieren zudem die Expression der kostimulatorischen Oberflächenmarker CD80 und CD86 von antigenpräsentierenden Zellen (Djouad et al. 2007, Uccelli et al. 2008). Außerdem wird die Produktion inflammatorischer Zytokine wie IL-2, TNF- α , IFN- γ vermindert, die Produktion des antiinflammatorischen Zytokin IL-10 jedoch erhöht (Aggarwal et al. 2005). Insgesamt sind viele der immunregulatorischen Mechanismen der MSCs von einer Stimulation durch IFN- γ abhängig (Polchert et al. 2008; Corcione et al. 2006).

Chiesa et al. wiesen in vivo nach, dass MSCs zudem einen direkten Einfluss auf die Reifung und Migration von dendritischen Zellen haben und auf diesem Wege zu einer ineffektiven Antigenpräsentation führen (Chiesa et al. 2011).

1.1.3.2 Immunstimulatorische Aspekte der Immunmodulation

Die immunregulatorische Wirkung von MSCs ist in der Literatur mehrfach beschrieben und in ihren Mechanismen vielfältig. Jedoch wurden auch immunstimulatorische Effekte festgestellt, die an diesem einseitigen Bild der MSCs rütteln. Zu diesem Aspekt der immunologischen Wirkung von MSCs ist die Datenlage jedoch noch sehr dünn und erlaubt deshalb bisher keine endgültigen Aussagen. In einer Studie von humanen MSCs an Multiple Sklerose Patienten zeigten Darlington et al., dass die Antwort von Th17-Zellen induziert wird und diese daraufhin weniger IL-10 produzieren (Darlington et al. 2010). Dies widerspricht der These der alleinigen Immunsuppression, da Th17-Zellen die Hauptproduzenten von Interleukin-17, einem proinflammatorischen Zytokin, sind. Des Weiteren handelt es sich bei IL-10 um ein immunsupprimierendes Zytokin, dessen Induktion bereits durch die Gabe von MSCs beobachtet wurde (Aggarwal et al. 2005). Um diese gegensätzlichen Ergebnisse zu erklären wird die Tatsache angeführt, dass Menschen im Gegensatz zu steril gehaltenen Mäusen, ständig äußeren Einflüssen ausgesetzt seien, welche entscheidende Veränderungen bezüglich der Immunantwort verursachen können (Darlington et al. 2010). Diese These wird von der Beobachtung gestützt, dass die Induktion von Th17-Zellen durch die Vorexposition mit IL-1 β verstärkt wird (Darlington et al. 2010).

Najar et al. stellten fest, dass die Lymphozyten in Abhängigkeit vom Verhältnis von MSCs zu Lymphozyten, auch zur Proliferation angeregt werden können (Najar et al. 2009). Diese Ergebnisse werden durch Zhou et al. untermauert, in deren Fokus CCL2 lag, welches sich wegweisend für die immunstimulatorischen Fähigkeiten der MSCs zeigte. *CC-chemokine ligand 2* (CCL2) wird von verschiedenen Zelltypen produziert und dient der Chemotaxis. Monozyten, T-Gedächtniszellen und dendritische Zellen

werden hierdurch zum Ort einer Verletzung oder Entzündung rekrutiert (Zhou et al. 2013). Ähnliche Ergebnisse bezüglich der Immunstimulation durch MSCs veröffentlichten auch Dazzi und Krampera 2011. Sie stellten fest, dass die immunologische Wirkung der MSCs von ihrem Milieu abhängt. Die Zellen agieren somit in der Anwesenheit von inflammatorischen Molekülen wie TNF- α und IFN- γ immunregulatorisch; sie können jedoch durch ein anderes Milieu genauso immunstimulatorisch wirken (Dazzi et al. 2011). Die Rolle verschiedener *toll-like*-Rezeptoren (TLR) stand hierbei im Vordergrund. Eine Stimulation durch TLR4 genauso wie eine Blockierung des IFN- γ Rezeptors konnte die Inhibition der T-Zellproliferation aufheben. Dazzi und Krampera wiesen darauf hin, dass es sehr wichtig sei das lokale Entzündungsmilieu eines Patienten mit einer chronisch-entzündlichen Erkrankung zu bedenken um den möglichen Erfolg einer Therapie mit MSCs abschätzen zu können (Dazzi et al. 2011). Waterman et al. führen diesen Ansatz in der hypothetischen Unterteilung der MSCs in einen proinflammatorischen (MSC1) und einen immunsuppressiven Typ (MSC2) weiter (Waterman et al. 2010).

1.2 Bakterielle Lungenentzündung

Die ambulant erworbene Pneumonie stellt weltweit die häufigste Infektionskrankheit dar (S3 Leitlinie - Tiefe Atemwegsinfektion und Pneumonie bei Erwachsenen 2009). Bei einer angenommenen Hospitalisierungsrate von 30- 50%, kann die jährliche Zahl der Erkrankungen in Deutschland auf etwa 400.000 bis 6.000.000 Fälle geschätzt werden.

Bei einer Pneumonie handelt es sich definitionsgemäß um ein neuauftretendes Infiltrat in der Thorax Röntgenaufnahme mit begleitender klinischer Symptomatik. Hierunter zählen insbesondere Fieber, produktiver oder nichtproduktiver Husten und Dyspnoe (Harrisons 2012).

1.2.1 Pathophysiologie

Das Respirationssystem verfügt über eine Vielzahl von verschiedenen Abwehrmechanismen, die das Eindringen von Mikroben/fremden Organismen in den Körper verhindern können. Größere Partikel werden bereits in Naso- oder Oropharynx aufgehalten und dringen somit nicht weiter in die Atemwege vor (Harrisons 2012). Gelangen Fremdkörper in das Bronchialsystem, werden diese von Bronchialsekret eingeschlossen und durch die mukoziliäre Clearance in Richtung Larynx abtransportiert (Harrisons 2012). Gelingt es Bakterien bis in die Alveolen vorzudringen, werden sie von Alveolarmakrophagen phagozytiert und dadurch eliminiert (Harrisons

2012). Übersteigt die Zahl der Pathogene jedoch die Kapazität der Alveolarmakrophagen, so entwickelt sich eine Pneumonie (Harrisons 2012).

Die bakterielle Pneumonie ist die häufigste Ursache für eine ALI (*acute lung injury*), welche oft zu einem respiratorischen Versagen führt (Eisner et al. 2001). Die größte Gefahr für das Lungenparenchym geht hierbei von einer überschießenden Immunantwort aus, welche die Funktionstüchtigkeit des Gewebes einschränkt. Diese Immunantwort des Respirationstrakts erfolgt unter Freisetzung von inflammatorischen Mediatoren und der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten (Ware et al. 2000). Durch verstärkte Freisetzung von inflammatorischen Mediatoren kommt es zu einer Schädigung der alveolokapillären Membran im Sinne eines ARDS (*acute respiratory distress syndrome*) (Harrisons 2012). Besonders die Pneumozyten Typ I, welche zu 90% die alveoläre Oberfläche bilden, werden hierdurch schnell verletzt. Zudem nimmt die Permeabilität der Gefäße zu (Ware et al. 2000), woraus ein Kapillarleck resultiert (Harrisons 2012). Es können also vermehrt Bestandteile des Blutes in die Alveolen übertreten (Ratjen et al. 1999; Lucas et al. 2009). Dies führt zu einem Lungenödem (Ware et al. 2000). Hierdurch kann es zum Abfall der Compliance und einer Hypoxämie kommen, die im schlimmsten Fall mit dem Tod des Patienten einhergehen kann (Harrisons 2012). Durch die eingeschränkte Integrität der Blut-Luft-Schranke kann es bei Patienten mit bakterieller Pneumonie zum septischen Schock kommen (Ware et al. 2000).

1.2.2 Einteilung der bakteriellen Lungenentzündung

Eingeteilt wird die Pneumonie nach verschiedenen Kriterien wie der anatomischen Lokalisation, der Ätiologie, klinischen Gesichtspunkten und dem Infektionsort. Die anatomische Unterscheidung zwischen alveolären und interstitiellen Pneumonien, sowie lobären (einen ganzen Lappen befallend) und lobulären (Herd-) Pneumonien hat therapeutisch kaum noch Bedeutung (Herold et al. 2011). Therapeutisch relevant ist die Einteilung nach Infektionsort. Die Einteilung erfolgt in ambulant erworbene – *community acquired pneumonia* (CAP), nosokomiale Pneumonien – *hospital acquired pneumonia* (HAP) und *ventilator-associated pneumonia* (VAP) (Harrisons 2012). Je nach Entstehungsort haben die Pneumonien unterschiedliche typische Erregerspektren. Typisches Erregerspektrum der HAP sind gram-negative Stäbchenbakterien wie zum Beispiel *Pseudomonas aeruginosa*, Enterobakteriaceae und *Haemophilus influenzae* (S3 Leitlinie - Nosokomiale Pneumonie). In der Gruppe der Enterobakteriaceae findet sich auch *Klebsiella pneumoniae*, das in dieser

Dissertation verwendete Bakterium. Dieses gehört zu den typischen Erregern einer nosokomialen Pneumonie.

Aufgrund von nichtsachgerechten Antibiotikagaben, mangelnder Hygiene in Krankenhäusern und der Beimischung von Glukopeptidantibiotika treten gerade bei den Erregern der nosokomialen Pneumonien immer häufiger Antibiotikaresistenzen auf (Herold et al. 2011).

1.2.3 Klebsiella pneumoniae: ein nosokomialen Erreger

Klebsiellen sind fakultativ pathologische Erreger. Beim Menschen ist eine Besiedlung des Gastrointestinaltrakts verbreitet. Bei stationär behandelten Patienten und Krankenhauspersonal ist die Rate dieser Besiedlung jedoch signifikant höher als die der Allgemeinbevölkerung (Podschun et al. 1998). Bei Patienten mit geschwächtem Immunsystem können sie verschiedene Krankheitsbilder wie Infektionen der Atemwege, Harnwegsinfektionen oder in seltenen Fällen als Maximalvariante der Infektion eine lebensbedrohliche Sepsis auslösen. Die beiden pathogenen Arten der Klebsiella sind *Klebsiella pneumoniae* und *Klebsiella oxytoca* (Hof et al. 2009). Sie nehmen gemeinsam mit den Enterobakterien den dritten Platz unter den nosokomialen Erregern ein. Wobei die Therapie von Klebsiellainfektionen immer als problematisch anzusehen ist, da Klebsiellen über eine natürliche Resistenz gegenüber Benzylpenicillin und Aminopenicilline verfügen (Hof et al. 2009). Hinzu kommen immer häufiger erworbene Resistenzen, die eine Antibiotikatherapie erschweren. Problematisch ist hierbei besonders die *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase: 1996 zuerst in den USA identifiziert, hat sie sich schnell über die ganze Welt verbreitet (Munoz-Price et al. 2013). So wurde mit der Resistenz gegeben Carbapeneme ein wichtiger Pfeiler der antibiotischen Therapie unwirksam und es muss deshalb häufig auf Reserveantibiotika wie Colistin, Gentamycin oder Tigazyklin zurückgegriffen werden (Munoz-Price et al. 2013). Allerdings sind auch gegen diese Antibiotika schon die ersten Resistenzen aufgetreten (Munoz-Price et al. 2013). Bei Versagen dieser Reservetherapie im Sinne einer Resistenz der Erreger bleiben keine weiteren Behandlungsoptionen um die Ausbreitung der Infektion zu kontrollieren (Munoz-Price et al. 2013).

1.2.4 Lungenentzündung im Mausmodell

1.2.4.1 Vorteile von Mäusen als Versuchstiere

Im Allgemeinen eignen sich Mäuse aufgrund ihrer unkomplizierten Haltung besonders als Versuchstiere. Dies ergibt sich aus ihrer Größe und ihrer raschen Reproduktion. Inzuchtstämme ermöglichen die Untersuchung genetisch gleicher Kohorten und erleichtern durch die Modifikation einzelner Gene die Erforschung molekularer Zusammenhänge von Krankheiten. Die Beliebtheit von Mäusen als Versuchstiere begünstigt weitere Mausexperimente, da hierbei auf einen breiten Fundus von Erfahrungswerten zurückgegriffen werden kann (Mizgerd et al. 2008).

1.2.4.2 Infizierungsmöglichkeiten

Bei der Wahl der Infizierung der Mäuse mit den Pneumonieerregern müssen mehrere Faktoren gegeneinander abgewogen werden. Mizgerd und Skerrett beschreiben in einem ausführlichen Artikel die verschiedenen Applikationsmöglichkeiten. Zum einen ist es wichtig eine möglichst natürliche Infektion zu induzieren, andererseits ist die Standardisierbarkeit der Infektion von entscheidender Bedeutung für die Reproduzierbarkeit und Objektivität der Studie. Hinzu kommt die Belastung für den Organismus der Maus durch den Vorgang der Infektion, besonders bei der direkten Applikation, da es sich hierbei um einen operativen Eingriff handelt. Das Zusammensetzen der zu infizierenden Maus mit einer kranken Maus bietet zum Beispiel eine sehr naturgetreue Infektion (Mizgerd et al. 2008). Auf diesem Weg können mehrere Tiere gleichzeitig ohne Narkose infiziert werden. Jedoch ist besonders bei Mäusen, die einen sehr schwachen Hustenreflex haben, die Last des Pathogens in der Ausatemluft nicht abschätzbar (Mizgerd et al. 2008). Als alternativen Infektionsweg kommt die artifizielle Exposition mit einem erregerhaltigen Aerosol auch ohne invasiven Eingriff aus. Wobei jedoch ein hierfür geeignetes Aerosol-Management-System erforderlich ist. Zudem kommt es bei der Aerosolexposition zu einer Kontamination von Fell und Augen, welche die Entzündungssymptomatik verfälschen kann (Mizgerd et al. 2008). Infektionsorte wie die direkte intratracheale, orotracheale oder intranasale Applikation erfordern eine Anästhesie und stellen somit eine zusätzliche Belastung für das Versuchstier dar. Die intranasale Applikation ist zwar in ihrer Handhabung einfach, ermöglicht aber keine Aussage, wohin genau die Pathogene im Respirationstrakt appliziert wurden (Mizgerd et al. 2008). Diese Variabilität kann durch direkte intratracheale Injektion oder orotracheale Intubation ausgeschlossen werden (Mizgerd 2008). Da für die direkte intratracheale Injektion zunächst die Trachea freipräpariert werden muss und dies eine schwere operative Belastung der Versuchstiere darstellt,

entschied man sich bei den Experimenten dieser Dissertation dafür, die Pathogene mittels orotrachealer Intubation zu applizieren. Diese wurde ausschließlich von geschultem Personal durchgeführt.

1.2.4.3 Übertragbarkeit des Mausmodells auf den Menschen

Zwischen Maus und Mensch gibt es sowohl anatomisch als auch physiologisch große Unterschiede, welche die Aussagekraft von Pneumoniemodellen an der Maus relativieren. Mäuse sind auf Grund ihrer anatomischen Voraussetzungen obligate Nasenatmer und verfügen über einen sehr schwachen Hustenreflex (Mizgerd et al. 2008). Ihr Bronchialbaum hat weniger Verzweigungen als der des Menschen und weist zellulär entscheidende Unterschiede auf (Mizgerd et al. 2008). Mäuse haben deutlich weniger Drüsengewebe in der Lunge. So fehlen zum Beispiel die submukösen Drüsen distal der Trachea vollständig (Mizgerd et al. 2008). Außerdem wird die Produktion von Lysozym größtenteils im Gegensatz zu humanen Lungen von den Pneumozyten Typ I übernommen (Mizgerd et al. 2008). Auch immunologisch unterscheiden sich Mäuse von Menschen, gerade bezüglich der Expression von *Toll like* Rezeptoren (Mizgerd et al. 2008). Daher sind die Ergebnisse aus solch einem Mausmodell keineswegs direkt auf den Menschen übertragbar, sondern bedürfen einer differenzierten Betrachtung (Mizgerd et al. 2008). Nichts desto trotz spielen Mausmodelle in der Grundlagenforschung eine bedeutende Rolle.

1.3 Dendritische Zellen in der Lunge

Als die wichtigsten professionell antigenpräsentierenden Zellen, stellen dendritischen Zellen (DC) eine Verbindung zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem her (Martin et al. 2009). Die dendritischen Zellen der Lunge lassen sich nach ihren unterschiedlichen Oberflächenprofilen in Subpopulationen unterteilen. Die einzelnen Subpopulationen der dendritischen Zellen unterscheiden sich grundlegend in ihren immunologischen Funktionen (Hackstein et al. 2013). Deshalb ist es wichtig diese einzeln zu betrachten um Aufschluss über die Reaktion der dendritischen Zellen als Gesamtes zu erhalten. Relevante DC-Subpopulationen in der Lunge sind die plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDC), die CD103+ dendritischen Zellen und die CD11b+ dendritischen Zellen (Kim et al. 2009). Die Hauptaufgabe der plasmazytoiden dendritischen Zellen besteht in der Produktion von Interferon während viraler Entzündungen. Sie sind trotz ihrer geringen Anzahl Hauptproduzent von Interferon α bei viralen Infektionen (Lande und Gilliet 2010; Bruel et al. 2014). Im Gegensatz zu

humanen pDC exprimieren murine pDC den Oberflächenmarker CD11c. Sie tragen kein CD11b und zeigen auf ihrer Oberfläche charakteristischerweise 120g8, mPDCA-1 und SiglecH (Hackstein et al. 2013).

CD103⁺ DCs sind migratorische dendritische Zellen (Ho et al. 2011). Nachdem sie Kontakt zu einem Antigen hatten, migrieren sie in die regionalen Lymphknoten. Dort präsentieren sie das Antigen naiven T-Zellen (Martin et al. 2009). Auf diese Weise sind sie maßgeblicher Bestandteil der T-Zellaktivierung im Falle einer Infektion. Besonders ihre Fähigkeit zur Antigenpräsentation auf dem MHC I Komplex macht sie zu einem entscheidenden Faktor für die Proliferation von naiven CD8⁺ T-Zellen (Ho et al. 2011). Treibende Kraft dieser Migration ist das Chemokin CCR7, dessen Rezeptor bei wandernden DCs hochreguliert wird. Manche Viren wie die Respiratorischen-Synzytial-Viren sind in der Lage die *CC- chemokine receptor 7* (CCR7) Produktion einzudämmen und verlangsamen so die Immunantwort durch Hemmung der T-Zellaktivierung (Le Nouën et al. 2011). Die Migration der DCs hat ihr Maximum nach 20 Stunden erreicht und geht danach trotz fortbestehender Infektion zurück. Eine mögliche Erklärung hierfür ist das Bestreben des Immunsystems sich selbst zu regulieren um Organschädigungen durch überschießende Reaktionen zu vermeiden (Ho et al. 2011; Neyt et al. 2013).

CD11b DCs sind neben den CD103⁺ DCs sehr starke CD4⁺ T-Zell Aktivatoren (Hackstein et al. 2013). verbleiben aber bei einer Infektion in der Lunge und migrieren nicht wie die CD103⁺ DCs in die mediastinalen Lymphknoten (Hackstein et al. 2013).

1.4 Fragestellung

Die übermäßige und leichtfertige Verordnung von Antibiotika und ihr unsachgemäßer Einsatz begünstigen die Entstehung von (Multi-)Resistenzen (Spellberg 2014). Infektionen mit solchen multiresistenten Erregern nehmen stetig zu (Boucher et al. 2009). Zudem kommt es zu Infektionen mit panresistenten Erregern, gegen die kein etabliertes Antibiotikum mehr wirksam ist. Hier muss auf Medikamente wie Colistin zurückgegriffen werden, welches aufgrund seiner Toxizität keine Verwendung mehr fand (Boucher et al. 2009). Dies führt zu schwerwiegenden Problemen bei der Antibiotikatherapie und stellt den behandelnden Arzt vor ein unausweichliches Dilemma. Ohne effektive Möglichkeiten Infektionen zu bekämpfen stehen viele Bereiche der modernen Medizin, seien es chirurgische Eingriffe, die Versorgung von Frühgeborenen, Chemotherapien oder die Intensiv- oder Transplantationsmedizin vor massiven Problemen (Guidos 2011). Der Verlust effektiver Antibiotikatherapien hätte

einen gewaltigen Anstieg der Morbidität und insbesondere der Mortalität bei Infektionen zur Folge (Guidos 2011). Um die Verwendung von Antibiotika einzuschränken, gewinnt die Suche nach alternativen Behandlungsstrategien zur Behandlung von Infektionen somit immer größeren Stellenwert. Die Gabe von mesenchymalen Stammzellen zur Therapie einer Pneumonie stellt eine vielversprechende Ergänzung beziehungsweise sogar eine mögliche Alternative zur Antibiotikatherapie dar.

Ziel dieser Arbeit ist es, die postakuten Auswirkungen einer Therapie mit mesenchymalen Stammzellen im Mauspneumoniemodell zu untersuchen. Hierzu wurde der fünfte Tag nach Infektion untersucht. Besonderes Augenmerk galt der Reaktion verschiedener immunologischer Zelltypen, darunter dendritischer Zellen, Lymphozyten und Makrophagen, auf die Infektion mit Klebsiellen und die Applikation von MSCs. Wichtiges Element dieser Dissertation ist die Frage, ob die applizierten MSCs nur die Immunantwort verringern oder die Pneumonie in ihrem Ausmaß abmildern. Zur Gewinnung dieser Erkenntnisse wurde ein Versuch im Mausmodell erarbeitet, in dem Mäuse zunächst mit Klebsiellen infiziert wurden und anschließend wurden einem Teil der Mäuse intratracheal MSCs appliziert. Über eine Zeit von fünf Tagen wurden die Versuchstiere beobachtet und klinische Daten erfasst. Nach fünf Tagen wurden die Tiere euthanasiert und Organmaterial wurde entnommen. Dieses Material wurde sowohl histologisch als auch durchflusszytometrisch analysiert. Diese Dissertation beschäftigt sich mit der durchflusszytometrischen Analyse von Lungengewebe und einer bronchoalveolären Lavage der Versuchstiere.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Tabelle 1: Geräte

Gerät	Hersteller
AutoMACS	Miltenyi Biotec, Bergisch- Gladbach, D
MidiMACS™ Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch- Gladbach, D
Brutschrank	Typ: HERAccl 240, CO ₂ Inkubator Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau, D
Durchflusszytometer	BD FACSCanto II + FACSDiva Software V6.1.3 BD BD FACSAria III + FACSDiva Software V6.1.3 Biosciences, Heidelberg, D
Mikroskop	Leica, Solms, D
Pipetten	Eppendorf, Wien, A <i>Microone,</i> <i>Engone, Star Lab, D</i>
Sterilbank	Safe 2020 Thermo Fisher Scientific Inc., Schwerte, D
Vortex	VWR International, D
Waage	Digitalwaage TP-500 DIPSE Digitalwaagen, Oldenburg, D
Wasserbad	Typ: WNB 10 Mettler GmbH+co. KG, Schwalbach D ED-5 Julabo, Seelbach, D
Zählkammer	Neubauer 0,0025mm ² / 0,1mm Brand GmbH, Schwerin, D
Zentrifugen	Rotina 380 Rotina 380 R Hettich, Tuttlingen, D

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Tabelle 2: Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller
Butterfly-Kanüle	Dispomed Witt oHG Gelnhausen, D
FACS Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, D Becton, Dickinson and Company BD Biosciences, San Jose, USA

Falconröhrchen	BD Labware, Le Pont De Claix, F
Insulin-Spritzen	OMNICAN Insulin 0,5ml/50 IU, 1 ml Braun, Melsungen, D
Skalpell	Sarstedt, Nümbrecht, D
Sterilfilter	Sartorius, Göttingen, D
Zellsiebe	BD, Erembodegem, B
Purecoat Zellkulturplatten (96, 24, 12, 6 well)	BD Labware, Le Pont De Claix, F
Zellkulturflaschen/Schalen	
Cellstar Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D

2.1.3 Versuchstiere

Tabelle 3: Versuchstiere

Stamm	Lieferant
C57BL/6N (Inzucht-Stamm)	Charles River Laboratories, Sulzfeld, D

2.1.4 Antikörper für FACS- Analyse

Tabelle 4: Antikörper zur FACS- Analyse

Antikörper	Fluorochrom	Hersteller	Klon	Isotyp	µg/10 ⁶ Zellen
120G8.04	FITC	Dendr	120G8.04	Rat IgG1, κ	1-10 µg
CCR7	BV421	BL	4B12	Rat IgG2a, κ	5 µg
CD103	PerCP-Cy5.5	BL	2E7	Arm Ham IgG	1 µg
CD105	APC	BL	MJ7/18	Rat IgG2a, κ	0,25 µg
CD117	PE	BL	ACK2	Rat IgG2b, κ	0,6 µg
CD11b	Pacific Blue	BL	M1/70	Rat IgG2b, κ	0,1 µg
CD11b	TexR	Invit	M1/70.15	Rat IgG2b, κ	0,1-0,25 µg
CD11c	BV605	BL	N418	Arm Ham IgG	0,25 µg
CD140a	APC	BL	APA5	Rat IgG2a, κ	1 µg
CD140a	PE	BL	APA5	Rat IgG2a, κ	0,25 µg
CD150	FITC	BL	TC15- 12F12.2	Rat IgG2a, λ	0,25 µg
CD19	PerCP-Cy5.5	BL	6D5	Rat IgG2a, κ	0,25 µg
CD202b	PE	BL	TEK4	Rat IgG1, κ	1 µg
CD274	PE	eBio	MIH5	Rat IgG2a, λ	0,06 µg
CD29	PE/Cy7	BL	HMB1-1	Arm Ham IgG	1 µg

CD309	PerCP-Cy5.5	BL	89B3A5	Rat IgG2a, κ	1 µg
CD31	Pacific Blue	BL	390	Rat IgG2a, κ	1 µg
CD34	PerCP-Cy5.5	BL	HM34	Arm Ham IgG	1 µg
CD3ε	PE	BL	145-2c11	Arm Ham IgG	0,25 µg
CD3ε	PE-Cy7	BL	145-2c11	Arm Ham IgG	0,5 µg
CD4	PE-Cy7	BL	GK1.5	Rat IgG2b, κ	0,25 µg
CD4	PerCP-Cy5.5	BL	GK1.5	Rat IgG2b, κ	0,25 µg
CD45	APC-Cy7	BL	30-F1	Rat IgG2b, κ	0,25 µg
CD45	BV510	BL	30-F1	Rat IgG2b, κ	0,5 µg
CD49b	Pacific Blue	BL	DX5	Rat IgM, κ	1 µg
CD49e	FITC	BL	5H10-27	Rat IgG2a, κ	2 µg
CD64(FcγRI)	APC	BL	X54-5/7.1	Mouse IgG1, κ	1 µg
CD86	PE	BD	GL1	Rat IgG2a, κ	1 µg
CD8a	APC	BL	53-6.7	Rat IgG2a, κ	1 µg
CD8a	FITC	BL	53-6.7	Rat IgG2a, κ	1 µg
CD90.2	APC/Cy7	BL	30-H12	Rat IgG2b, κ	0,25 µg
F4/80	PB	BL	BM8	Rat IgG2a, κ	0,25 µg
FcεRIα(MAR1)	PE-Cy7	BL	MAR-1	Arm Ham IgG	0,5 µg
I-A/I-E	APC-Cy7	BL	M5/114.15.2	Rat IgG2b, κ	0,25 µg
I-Ab (MHC II)	FITC	BL	AF-120.1	Mouse IgG2a, κ	1 µg
IL-10	APC	BL	JES5-16E	Rat IgG2b, κ	0,25 µg
IL-17	APC	eBio	eBio17B7	Rat IgG2a, κ	0,125 µg
IL-4	PE	eBio	11B11	Rat IgG1, κ	0,06 µg
IFN-γ	PE	BL	XMG1.2	Rat IgG1, κ	0,25 µg
Ly-6G	BV421	BL	1A8	Rat IgG2a, κ	0,5 µg
Ly-6G/Ly-6C (GR1)	APC	BL	RB6-8C5	Rat IgG2b, κ	0,25 µg
NK-1.1	Pacific Blue	BL	PK136	Mouse IgG2a, κ	0,5 µg
SCA-1	PE/Cy7	BL	D7	Rat IgG2a, κ	0,25 µg
SCA-1	PerCP-Cy5.5	BL	D7	Rat IgG2a, κ	0,25 µg
SiglecF	PE	BD	E50-2440	Rat IgG2a, κ	0,25 µg
	BV421	BD	E50-2440	Rat IgG2a, κ	0,25 µg
TCR α/β	BV421	BL	H57-957	Arm Ham IgG	0,25 µg
TCR γ/δ	FITC	BL	GL3	Hamster IgG	1 µg

TER119	FITC	BL	TER-119	Rat IgG2b, κ	1 µg
CD25	FITC	BL	PC61	Rat IgG1 λ	0,5 µg
FoxP3	APC	eBio	FJK- 16s	IgG2a, λ	1-2 µg

Tabelle 5: Abkürzungen der Herstellernamen

Hersteller	Abkürzung
Biolegend, Fell, D	BL
BD Bioscience, Heidelberg, D	BD
eBioscience, Wien, A	eBio
Invitrogen, Carlsbad, D	Invitr
Dendritic, Imgegenx, San Diego, USA	Dendr

2.1.5 Mikropartikel für FACS- Kompensation und MACs

Tabelle 6: Mikropartikel für FACS- Kompensation und MACs

Mikropartikel	Hersteller
Anti-Mouse IgG,κ Neg. Control Compensation Particles Set	BD Pharmingen™, Heidelberg, D Isicomp, Gießen, D
Anti-Rat and Anti-Hamster IgG,κ Neg. Control Compensation Particles Set	BD Pharmingen™, Heidelberg, D Isicomp, Gießen, D
CD45 MACS Mikropartikel	Miltenyi, Bergisch- Gladbach, D
Spherotec Mikropartikel	Spherotec, Fulda, D

2.1.6 Chemikalien, Kulturmedien

Tabelle 7: Chemikalien, Kulturmedien

Chemikalien	Hersteller
Ethanol (70%, 99,9%)	Roth, Karlsruhe, D
PAN SERA ES	PAN Biotech, Aidenbach, D
HBSS	PAA Laboratories, Pasching, A
Heparin-Natrium-25 000-ratiopharm (Durchstechflaschen)	Ratiopharm, Ulm, D
Isofluran	Baxter GmbH, Unterschleißheim, D
Maus Serum	eigene Herstellung
Penicillin/Streptomycin Lösung (50µg/ml)	PAA Laboratories, Pasching, D
Humanes Plättchen Lysat	Blutbank, Uniklinikum Gießen
RPMI 1640 Medium	PAA Laboratories, Pasching, A
α- MEM eagle	PAN Biotech, Aidenbach, D
Kollagenase	Wako Chemicals, Japan
Sytox	Invitrogen, Darmstadt, D

Trypanblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
MacConkey-Agar Platten Nr. 3	Oxoid, Basingstoke, UK
PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Ionomycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
BrefeldinA	eBioscience, Wien, A
Fixation/Permeabilization Solution Kit	eBioscience, Wien, A

2.1.7 Proteinbestimmung

FlowCytomix Kits der Firma BD (BD Bioscience, Heidelberg, D)

Test für IL-10, IL-12p70, IFN- γ , IFN- α und TNF- α

Bestimmung des Gesamtproteins nach der CBA Methode

Kit der Firma Biorad (Hercules, USA)

2.1.8 Verwendete Puffer und Medien

Verdaupuffer zur Knochenpräparation

Angaben pro Maus:

- 5 ml α - MEM /10% FKS
- 50 μ l von HEPES (1 M)
- 46,6 μ l Kollagenase (Aktivität: 300 U/mg)
- 50 μ l CaCl_2 (0,3 M)

Verdaupuffer zur Erstellung des Lungenhomogenats

Angaben pro Maus:

- 5 ml RPMI/ 10% FKS
- 1% Penicillin-Streptomycin Medium
- 700 μ l Collagenase A
- 5 μ l DNase

Einfriermedium

- 60% MesenPRO RS™ Medium
- 30% FKS
- 10% Dimethylsulfoxid

Kultur-Medium für mesenchymale Stammzellen

MesenPRO RS™ Stammzellmedium

- MesenPRO RS™ Medium
- MesenPRO RS™ Groth supplements
- 20% PAN SERA ES
- 1% L-Glutamin
- 1% Penicillin-Streptomycin

Alternativ: HPL MEDIUM

- α - MEM + Glutamin
- 1% Penicillin-Streptomycin
- 5% FKS
- 5% HPL
- 2 U/ml Heparin

2.2 Methoden

2.2.1 FACS Durchflusszytometrie

Bei dieser Methode werden Moleküle der zu untersuchenden Zellen mit Antikörpern markiert. Diese sind wiederum an Fluorochrome gebunden. Die Zellsuspension wird von einem geeigneten Gerät (hier FACS Aria III oder FACS Canto II von BD) tropfenförmig vereinzelt und an Lasern verschiedener Wellenlängen vorbeigeleitet. Der Strahl der Laser wird von den Zellen absorbiert bzw. abgelenkt. Dies wird von den Detektoren des Geräts aufgezeichnet. Die so erzeugten Daten geben Aufschluss über die Größe, als auch über die Granularität der Zellen, die als Punktwolkendiagramm (Dot- Plot) aufgezeichnet werden. Durch Intensität der Reflektion gebundener Fluorochrome durch den Laser der entsprechenden Wellenlänge ist es möglich Zellen aufgrund ihres Antikörperbindungsprofils zu differenzieren. Die Bestimmung der absoluten Zellzahl bei der Durchflusszytometrie erfolgte mit fluoreszierenden Mikropartikeln (*accucount fluorecent particles*) der Firma Spherotec. Dazu wurde eine

exakte Anzahl an Partikeln in ein definiertes Testvolumen geben. Zur Messung wurden ein Leukozytengate und ein Mikropartikelgate eingesetzt. Nach folgender Formel wurden die absoluten Zellzahlen errechnet.

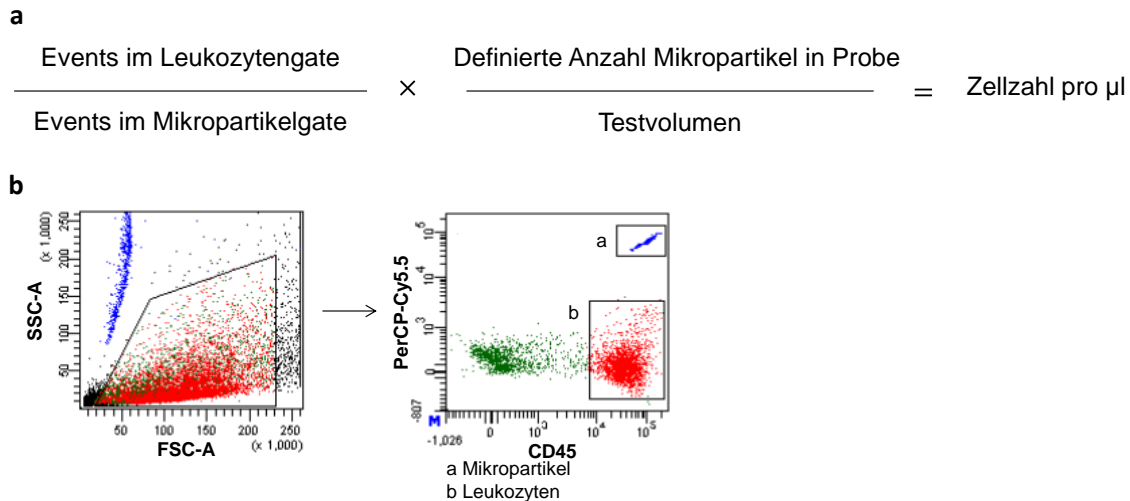


Abbildung 3: Zellzahlbestimmung mittels Spherotec- Partikeln

a Formel zur Bestimmung der absoluten Zellzahl

b Gatingschema Zellzahlbestimmung

nach setzen eines Zellgates werden die Leukozyten nach CD45 definiert und die Spherotec- Partikel als eigene Wolke abgegrenzt

2.2.2 In vitro Expansion von murinen mesenchymalen Stammzellen

2.2.2.1 Gewebepräparation

Zur Gewinnung von murinen MSCs wurden Humerus, Tibia und Femur von toten Mäusen (B16N) präpariert. Die Knochen wurden mit einem Skalpell zerkleinert und in Verdauopuffer eine Stunde bei 37 °C im Wasserbad inkubiert und aufgelöst. Es erfolgte zunächst ein Filtrationschritt durch ein Zellsieb (40 μm) gefolgt von einem Waschschrift, hierbei wurde die Suspension in einem 50ml Falcon mit HBSS aufgefüllt und zentrifugiert (7 min, 500 g, 4 °C) danach wurde der Überstand abgegossen. Die Erythrozyten wurden mit Erythrozytenlyse lysiert, abschließend wurde die Erythrozytenlyse durch einen 2. Waschschrift abgewaschen.

2.2.2.2 Zellsortierung

Nach einem weiteren Waschschrift wurden die CD45⁺ Leukozyten mit CD45 Mikropartikeln der Firma Miltenyi markiert und nach Herstellerprotokoll durch ein MACS (magnetic antibody cell sorting) Verfahren entfernt. Anschließend wurden die Zellen zur FACS- Sortierung gefärbt.

Tabelle 8 – Antikörper zur FACS Sortierung von MSCs

Ausschluss der Leukozyten	CD45	FITC
Ausschluss der Erythrozyten	TER119	FITC
Mesenchymale Stammzellmarker	CD140	APC
	Sca-1	Pe/Cy-7

Schließlich wurden am FACS Aria III in einem Sortierungsverfahren die MSCs, definiert durch die Oberflächenmerkmale CD45-, TER119-, CD140+, dies entspricht PDGFR α und Sca-1, mit einer Reinheit von mindestens 95% von allen anderen Knochenmarkzellen getrennt. Die so gewonnenen Stammzellen wurden mit MSC Medium in Kultur aufgenommen.

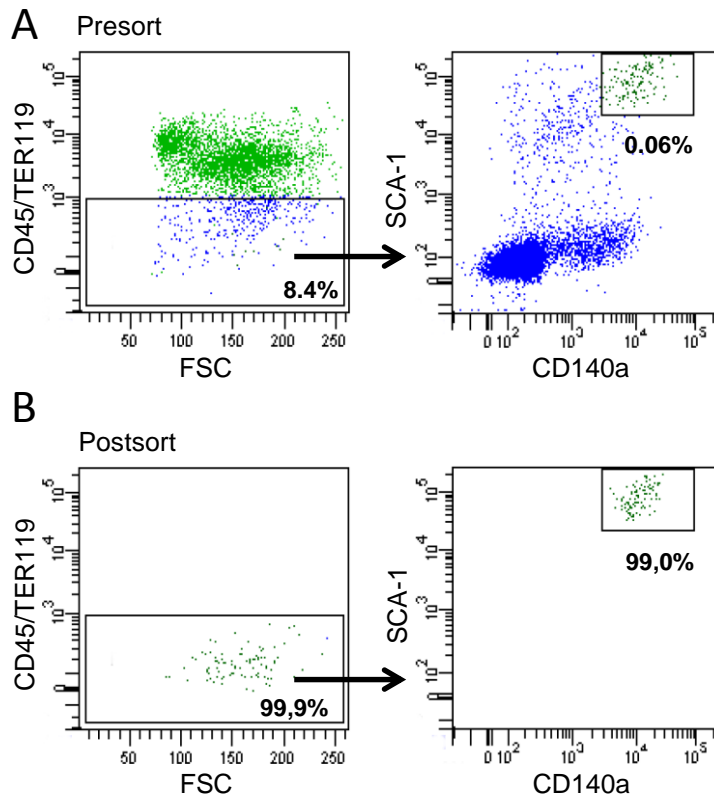


Abbildung 4: Gatingschema der MSC Zellsortierung

A Sortierung

Die Leukozyten und Erythrozyten wurden mittels CD45 und TER119 ausgeschlossen, danach wurden die Sca-1⁺CD140a⁺ MSCs im Sca-1/CD140 Punktwolkendiagramm identifiziert

B Sortierungskontrolle

Zur Kontrolle der Reinheit wurden die sortierten Zellen in einem Sca-1/CD140 Punktwolkendiagramm aufgetragen

2.2.3 Versuche zur Immunmodulation von MSCs in einer Klebsiella

Pneumonie

Alle in vivo Versuche wurden nach dem Tierversuchsantrag „Gram-negative Pneumonie und mesenchymale Stammzellen“ V54-19c2015/1; GI 2018 Nr. 75/2011) durchgeführt. Die Organentnahmen wurden nur an toten Tieren durchgeführt, alle Arbeitsschritte wurden ausschließlich von dafür geschultem Personal durchgeführt.

2.2.3.1 Versuchstiere

Die Mäuse des Stamms C57/BL/6NCrl wurden bei Charles River erworben und bis zu ihrer Verwendung pathogenfrei in der SPF- Anlage des Tierstalls der Universität Gießen gehalten. Für die Versuche wurden Tiere mit einem Gewicht zwischen 20 g und 25 g verwendet.

2.2.3.2 Gewebepräparation

Die Versuchstiere wurden mittels Isofluraninhalation getötet, desinfiziert, das Abdomen eröffnet, die Haut über dem Brustkorb entfernt, das Zwerchfell von kaudal eigeschnitten und der Thorax eröffnet. Nach Spülung des Thoraxraums wurde der linke Vorhof eröffnet und die Vena cava inferior zum leichteren Abfluss der Spülflüssigkeit durchtrennt. Der rechte Ventrikel wurde punktiert und die Lunge mit 15 ml HBSS gespült. Die einzelnen Lungenlappen wurden entfernt und in eine Petrischale überführt. Hier wurden sie mittels Verdaupuffer, Zerkleinerung mit einem Skalpell und anschließender einstündiger Inkubation im Wasserbad (37 °C) verdaut und anschließend durch Aspiration in eine Spritze fein vereinzelt und durch ein Zellsieb (70 µm) filtriert und zentrifugiert (7 min, 500 g, 4 °C). Nun erfolgte ein weiterer Waschschrift. An Tag 5 der Klebsiellapneumonie wurden die Mäuse zur Auswertung getötet und präpariert, inklusive einer bronchoalveoläre Lavage mit NaCl. Ferner wurden die Lunge und jeweils 3 mediastinale Lymphknoten entnommen. Die Zellzahl der bronchoalveolären Lavage wurde mit Hilfe der Neubauer Zählkammer bestimmt.

2.2.3.3 Analyse mittels FACS Färbung

Anschließend wurde eine FACS Färbung hinsichtlich des Vorkommens von Granulozyten, Makrophagen und dendritischer Zellen durchgeführt. Zur Zytokinbestimmung wurde der azelluläre Anteil der BAL mittels eines FlowCytomix Kits der Firma BD nach Herstellerangaben getestet auf die Bestimmung des Gesamtproteins in der BAL erfolgte nach der CBA Methode.

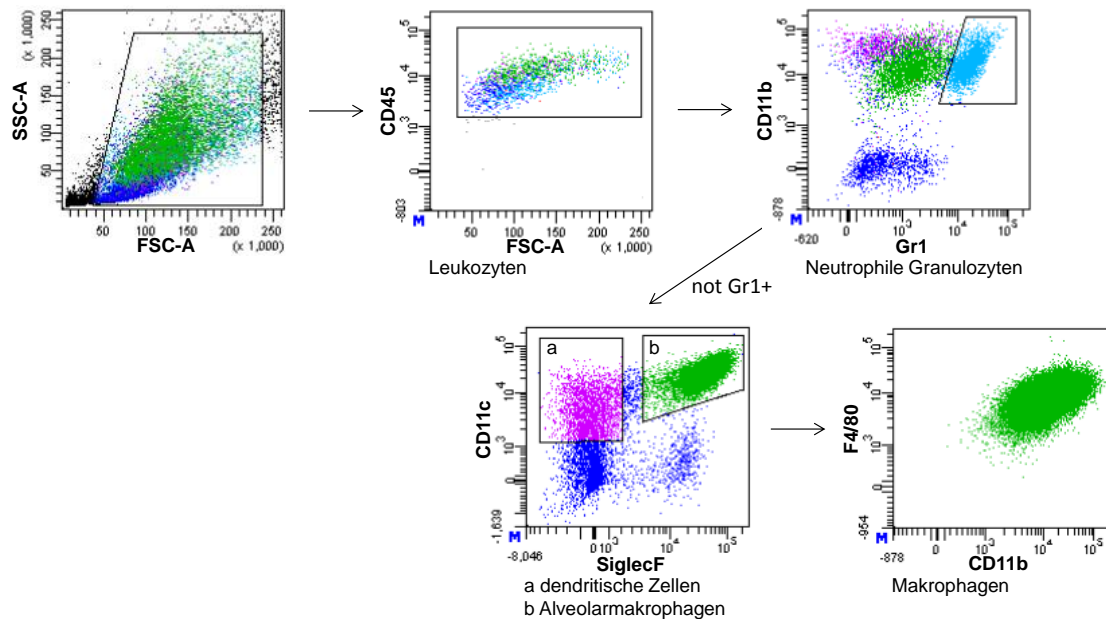


Abbildung 5: Gatingstrategie zur Identifikation von Granulozyten und Markophagen in der BAL

Aus den Leukozyten (CD45⁺) wurden zunächst die neutrophilen Granulozyten (CD11b⁺Gr1⁺) mittels CD11b und Gr1 abgegrenzt. Die verbleibenden Zellen wurden nach CD11c und SiglecF aufgetragen. Dendritische Zellen (CD11c⁺) und Makrophagen (CD11c⁺SiglecF⁺F4/80⁺) wurden voneinander abgegrenzt. Die Makrophagen wurden anhand eines weiteren charakteristischen Oberflächenmarkers F4/80 kontrolliert.

Die präparierte Lunge und die Lymphknoten wurden in Verdauopuffer gelöst, einer Erythrozytenlyse unterzogen, gewaschen und in 100 µl HBSS aufgenommen. Anschließend wurden sowohl eine extrazelluläre als auch eine intrazelluläre FACS Färbung durchgeführt. Zur extrazellulären Färbung wurde die Zellzahl auf 1×10^6 Zellen/100 µl mit HBSS eingestellt, es wurden 10 µl Mausserum dazugegeben und 15 min auf Eis inkubiert, anschließend erfolgte ein Waschschriff durch Zentrifugation (5 min, 500 g, 4 °C) und erneute Aufnahme in HBSS. Nun wurden entsprechende Antikörper appliziert und die Proben 30 min in Dunkelheit inkubiert. Nun erfolgten ein wiederum ein Waschriff mit 2 ml HBSS und eine Zentrifugation (10 min, 400 g, 4 °C). Der Überstand wurde abgekippt und mit HBSS auf ein Volumen von 100- 200 µl eingestellt. Nun wurden die Proben durchflusszytometrisch an einem BD FACSCanto II gemessen. Wurde eine intrazelluläre Färbung vorgenommen, so erfolgte diese nach extrazellulärer Färbung. Zur intrazellulären Färbung wurden die Zellen zunächst fixiert und permeabilisiert. Entsprechend der Herstellerangaben wurden das Perm/Fix Konzentrat mit dem Perm/Fix Verdünnungsmittel im Verhältnis 1:4 verdünnt. 1 ml dieser Lösung wurde zu den bereits extrazellulär gefärbten Proben gegeben, mit dem Vortexgerät vermischt und 30 min in Dunkelheit bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden

zentrifugiert (500 g, 5 min, 4 °C), der Überstand abgekippt und die Zellen erneut vermischt. Es folgte ein Waschschrift mit 2 ml Permeabilisationspuffer einschließlich Zentrifugation (500 g, 5 min, 4 °C). Zuvor wurde der Permeabilisationspuffer 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt. Nun wurden 10 µl Mausserum hinzugefügt und 10 min in Dunkelheit bei 4 °C inkubiert. Es wurden die entsprechenden Antikörper appliziert und weitere 30 min in Dunkelheit bei 4 °C inkubiert. Abschließend wurden 2 Waschschriffe mit dem Permeabilisationspuffer einschließlich Zentrifugation (500 g, 5 min, 4 °C) durchgeführt und die Proben am BD FACSCanto II gemessen.

Zur Bestimmung der Bakterienlast, wurden bronchoalveoläre Lavage und Lungenhomogenat auf MacConkey-Agar Platten ausgestrichen und bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 6 Stunden wurden die entstandenen Kolonien die CFU bestimmt.

2.2.3.4 Durchflusszytometrische Analyse der Lunge

2.2.3.4.1 Gatingstrategie zur Identifikation von Granulozyten und Markophagen in der Lunge

Das Gating nach Granulozyten und Makrophagen erfolgte analog zur Gatingstrategie der BAL.

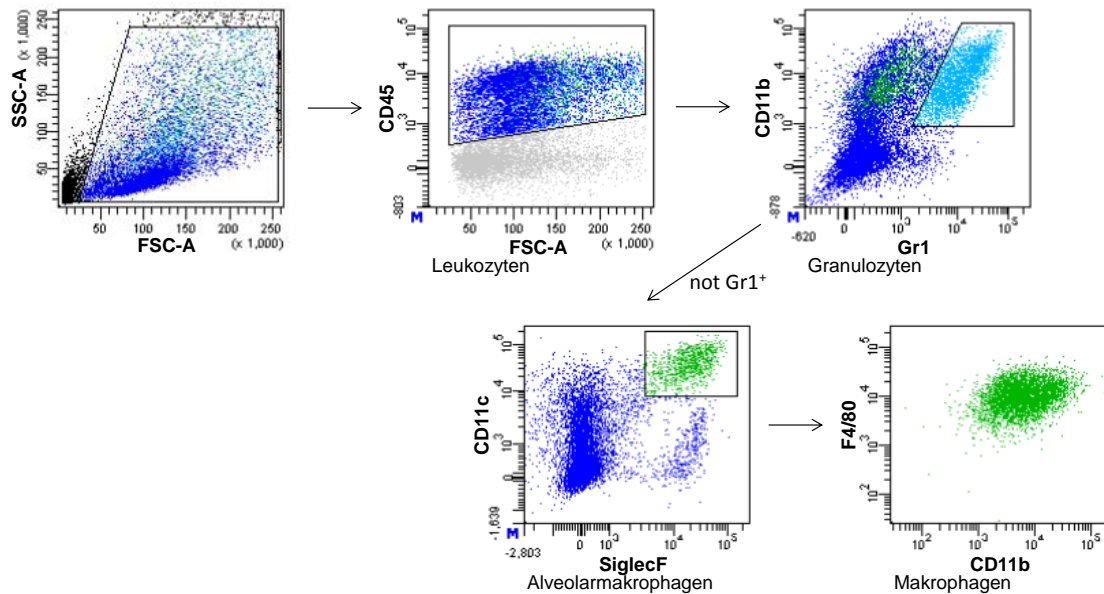


Abbildung 6: Gatingstrategie zur Identifikation von Granulozyten und Makrophagen in der Lunge

Aus den Leukozyten ($CD45^+$) wurden zunächst die neutrophilen Granulozyten ($CD11b^+Gr1^+$) mittels CD11b und Gr1 abgegrenzt. Die verbleibenden Zellen wurden nach CD11c und SiglecF aufgetragen. Die Makrophagen ($CD11c^+SiglecF^+F4/80^+$) nach SiglecF und CD11c identifiziert und nach F4/80 überprüft.

2.2.3.4.2 Gatingstrategie zur Identifikation myeloider Subpopulationen

Nach Setzen eines Zellgates im Vorwärts-/Seitwärtskette (FSC/SSC)

Punktwolkendiagramm wurden zunächst nach CD45 die Leukozyten gegatet. Das Gating der myeloiden Zellen erfolgte über CD11c zur Abgrenzung der dendritischen Zellen und anschließend deren Aufschlüsselung in die Subtypen CD103 DCs und CD11b DCs. Die plasmazytoiden dendritischen Zellen wurden gesondert gegatet. Nach Ausschluss der neutrophilen Granulozyten, der Alveolarmakrophagen, der natürlichen Killerzellen und der B-Lymphozyten wurden schrittweise die pDCs nach ihren charakteristischen Oberflächenmarkern CD11c, B220, MPDCA1 und SiglecH abgegrenzt.

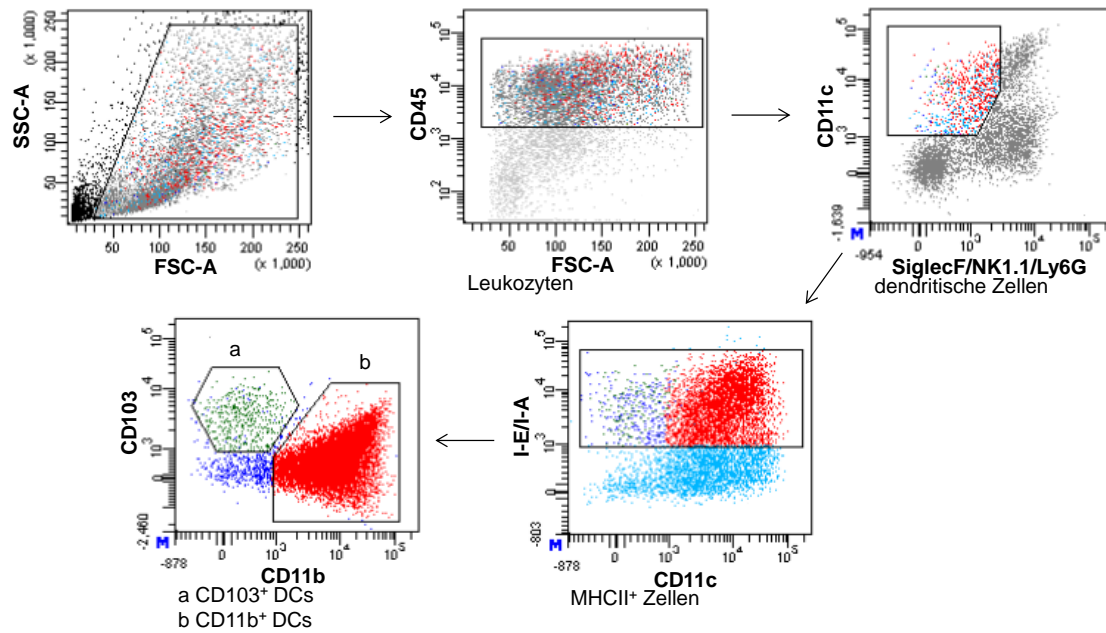


Abbildung 7: Gatingschema zur Identifikation dendritischer Subpopulationen in der Lunge

Aus den Leukozyten (CD45⁺) wurde zunächst die Gesamtheit der DCs (CD11c⁺SiglecF⁺NK1.1⁺Ly6g⁺) erfasst. Aus diesen wurden nach Ausschluss aller MHCII⁻ Zellen CD103⁺ DCs (MHCII⁺CD103⁺) und CD11b⁺ DCs (MHCII⁺CD11b⁺) differenziert.

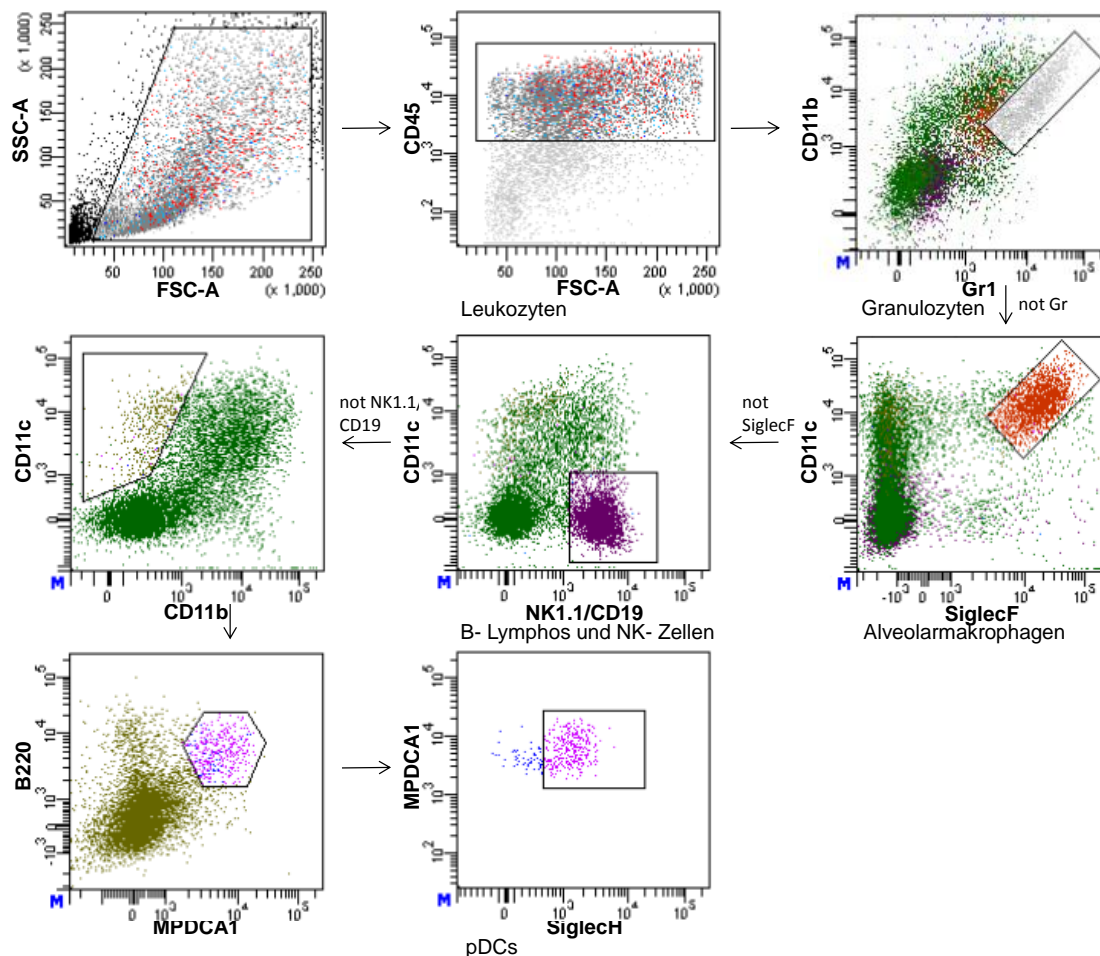


Abbildung 8: Gatingschema zur Identifikation plasmazytoider dendritischer Zellen

Aus den Leukozyten (CD45+) wurden zunächst die neutrophilen Granulozyten (CD11c+Gr1+) dann die Alveolarmakrophagen (SiglecF+) und dann natürliche Killerzellen und B- Lymphozyten (NK1.1+CD19+) ausgeschlossen. Daraufhin wurden schrittweise die pDCs (CD11b-CD11c+B220+MPDCA1+SiglecH+) abgegrenzt.

2.2.3.4.3 Gatingstrategie zur Identifikation der lymphatischen Subpopulationen

Bezüglich des Gatings zur Identifikation lymphatischer Subpopulationen wurde nach Ausschluss sehr kleiner und großer Partikel über Vorwärts-/Seitwärtskette (FSC/SSC) alle CD45+ Leukozyten gegatet. Aus diesem wurden kleine, wenig granuläre Zellen weiter analysiert. Es wurden NK1.1 exprimierende natürliche Killerzellen, B-Zellen, gdTCR⁺ Zellen betrachtet, zudem wurden T-Zellen weiter in CD4⁺ T-Zellen und CD8⁺ T-Zellen unterteilt. Zur speziellen Betrachtung der regulatorischen T- Zellen wurden zunächst wie oben genannt T-Zellen identifiziert und daraufhin auf ihre Expression von CD25 und FoxP3 untersucht.

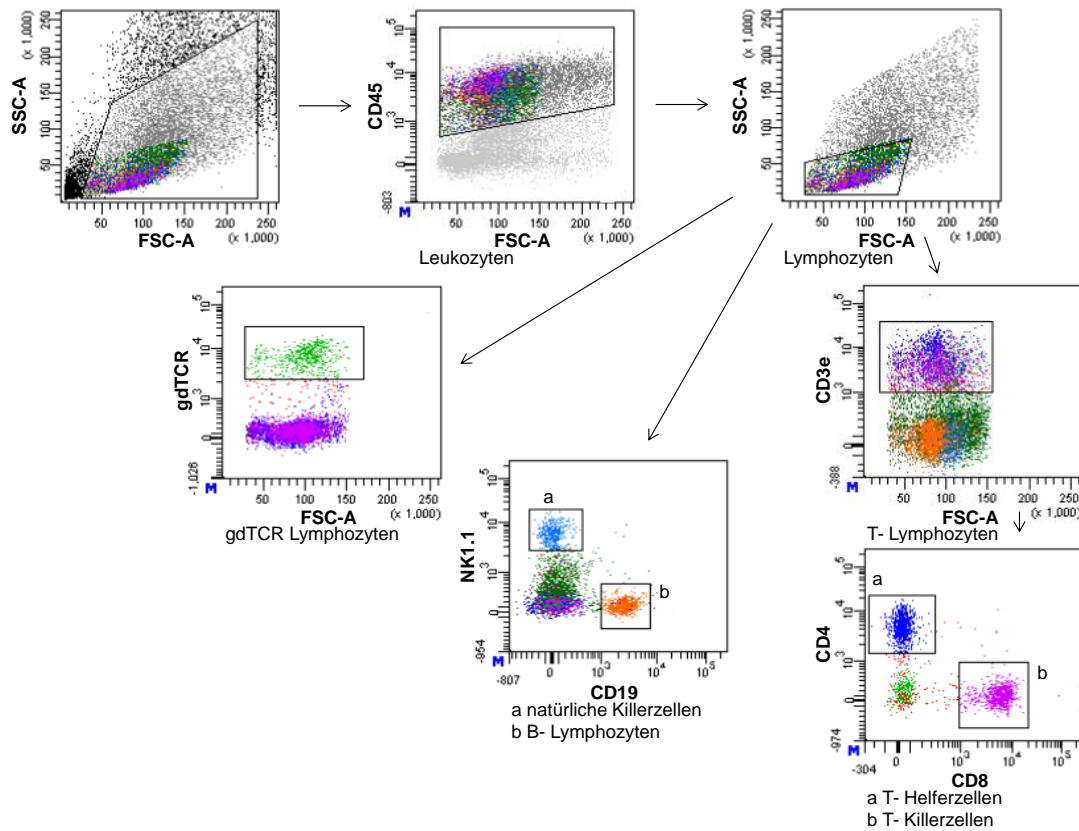


Abbildung 9: Gatingschema lymphozytärer Populationen der Lunge

Nach Ausschluss der CD45⁺-Zellen wurde die Fraktion der kleinen Zellen weiter analysiert. Die T-Zellen (CD3⁺) wurden weiter in CD4⁺ T-Zellen und CD8⁺ T-Zellen unterteilt. Die natürlichen Killerzellen (NK1.1⁺) und die B-Lymphozyten (CD19⁺) wurden in einem Punktwolkendiagramm, in dem NK1.1 und CD19 angetragen wurden, voneinander abgegrenzt. Schließlich wurde die Population der gdTCR Lymphozyten (gdTCR⁺) bestimmt.

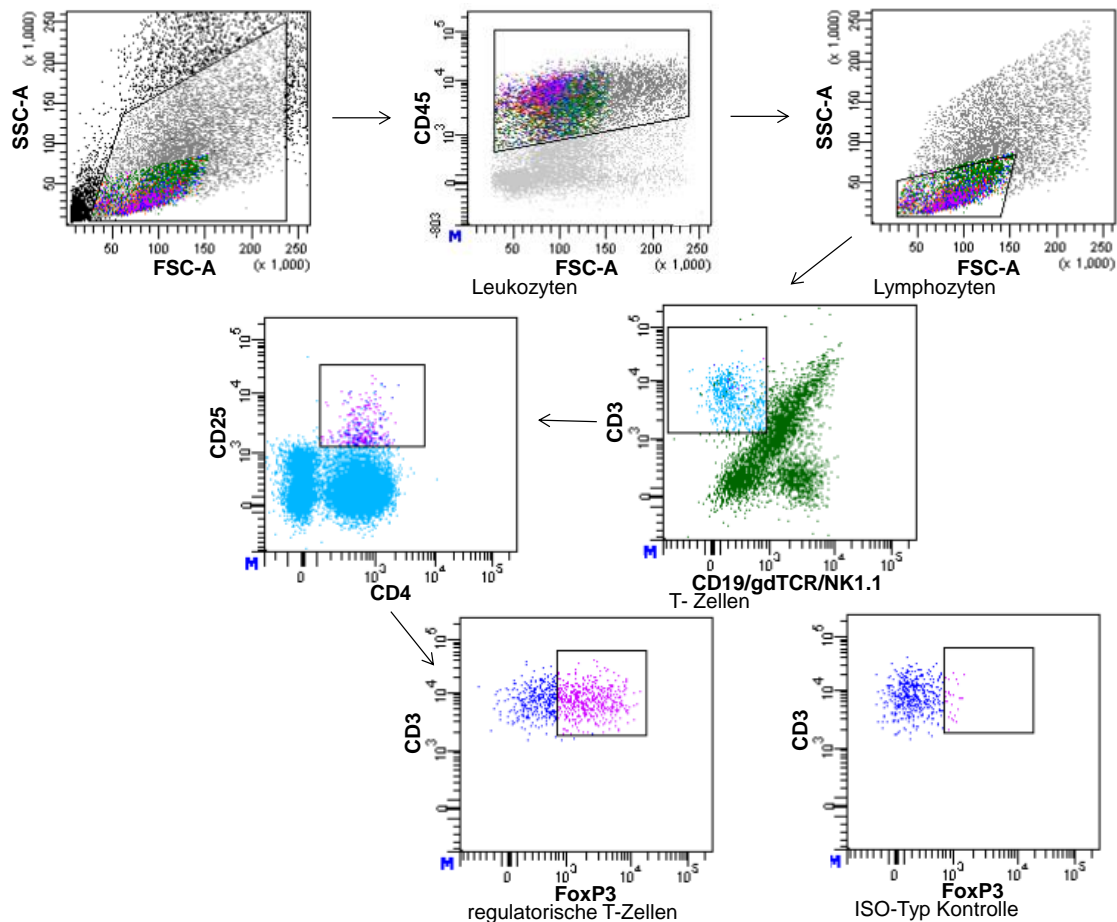


Abbildung 10: Gatingschema zur Identifikation von regulatorischen T-Lymphozyten

Nach Ausschluss der $CD45^+$ Zellen wurde die Fraktion der kleinen Zellen weiter analysiert. Aus den T-Zellen ($CD3^+$) wurden schrittweise die regulatorischen T-Zellen ($CD4^+CD25^+FoxP3^+$) abgegrenzt.

2.2.3.4.4 Intrazelluläre Zytokinfärbung der $CD4^+$ T-Zellen und $CD8^+$ T-Zellen

Die Lymphozyten der Lunge wurden zunächst stimuliert. Zu diesem Zweck wurden PMA in einer Konzentration von 50 ng/ml, Inomycin 1 µg/ml und BrefeldinA 1 µg/ml zugegeben und über 6 Stunden bei 37 °C stimuliert. Nun wurde zentrifugiert (500 g, 5 min, 4 °C) und die Proben mit HBSS auf 100 µl aufgefüllt. Es wurden 10 µl Mausserum hinzugefügt und 15 min bei 20 °C in Dunkelheit inkubiert. Anschließend erfolgte eine extrazelluläre Oberflächenfärbung analog zu den bereits beschriebenen Verfahren mit CD45, CD3, abTCR, CD4 und CD8 zur Identifizierung der $CD4^+$ T-Zellen und $CD8^+$ T-Zellen. Danach wurden die Zellen nach einem Waschschrift (500 g, 5 min, 4 °C) fixiert und permeabilisiert. Hierzu wurde das Fixation/Permeabilization Solution Kit der Firma eBioscience verwendet. Es wurden 500 µl Fixation/ Permeabilization Lösung zugeben und die Proben 20 min bei 20 °C in Dunkelheit inkubiert. Dann wurde zentrifugiert (500 g, 5 min, 4 °C) und die Proben in 2ml Perm/ Wash Puffer aus dem

Fixation/Permeabilization Solution Kit der Firma eBioscience aufgenommen. Es wurde für 10 min bei 20 °C in Dunkelheit inkubiert, dann zentrifugiert (500 g, 5 min, 4 °C), in 10 µl Mausserum aufgenommen und erneut 10 min bei 20 °C in Dunkelheit inkubiert. Abschließend wurden die Antikörper für die intrazelluläre Färbung auf die nun permeabilisierten Zellen gegeben und konnten auf diese Weise ins Zytosol gelangen. Die Proben wurden 30 min bei 20 °C in Dunkelheit inkubiert. Es wurden 2 ml Perm/Wash Puffer hinzugegeben und es erfolgten 2 Waschschrte (500 g, 5 min, 4 °C). Die Gatingstrategie erfolgte analog zu der der lymphatischen Subpopulationen um CD4⁺ T-Zellen und CD8⁺ T-Zellen zu identifizieren. Die Bestimmung der Zytokinproduktion erfolgte für diese beiden Zelltypen. Für die intrazelluläre Färbung wurden Antikörper gegen die Zytokine IFN- γ , IL-10, IL-4 und IL-17 verwendet. Die gemessene Zytokinproduktion wurde jeweils mit der entsprechenden ISO- Typenkontrolle verglichen.

2.2.3.4.5 Gatingstrategie zur Bestimmung der Vitalität unterschiedlicher Zelltypen

Die Populationen der neutrophilen Granulozyten, der natürlichen Killerzellen, der Alveolarmakrophagen und der epithelialen Zellen wurden auf ihre Vitalität untersucht. Hierzu wurde in einem Punktwolkendiagramm Sytox, ein Farbstoff, der durch die Membran toter Zellen dringt. Bei Annexin-V handelt es sich um ein Protein, welches mit hoher Affinität an Phosphatidylserin bindet. Phosphatidylserin wird bei Einleitung der Apoptose auf die Außenseite der Zellmembran transloziert und dient der Erkennung apoptotischer Zellen durch Makrophagen. Somit gibt die Möglichkeit zur Bindung von Annexin-V Aufschluss über apoptotische Vorgänge in der betreffenden Zelle (Wlodkowic et al. 2012). Lebende Zellen, waren für beide Färbungen negativ. Die alleinige Bindung von Sytox ohne Annexin-V ist Indikator für nekrotische oder spätapoptotische Vorgänge.

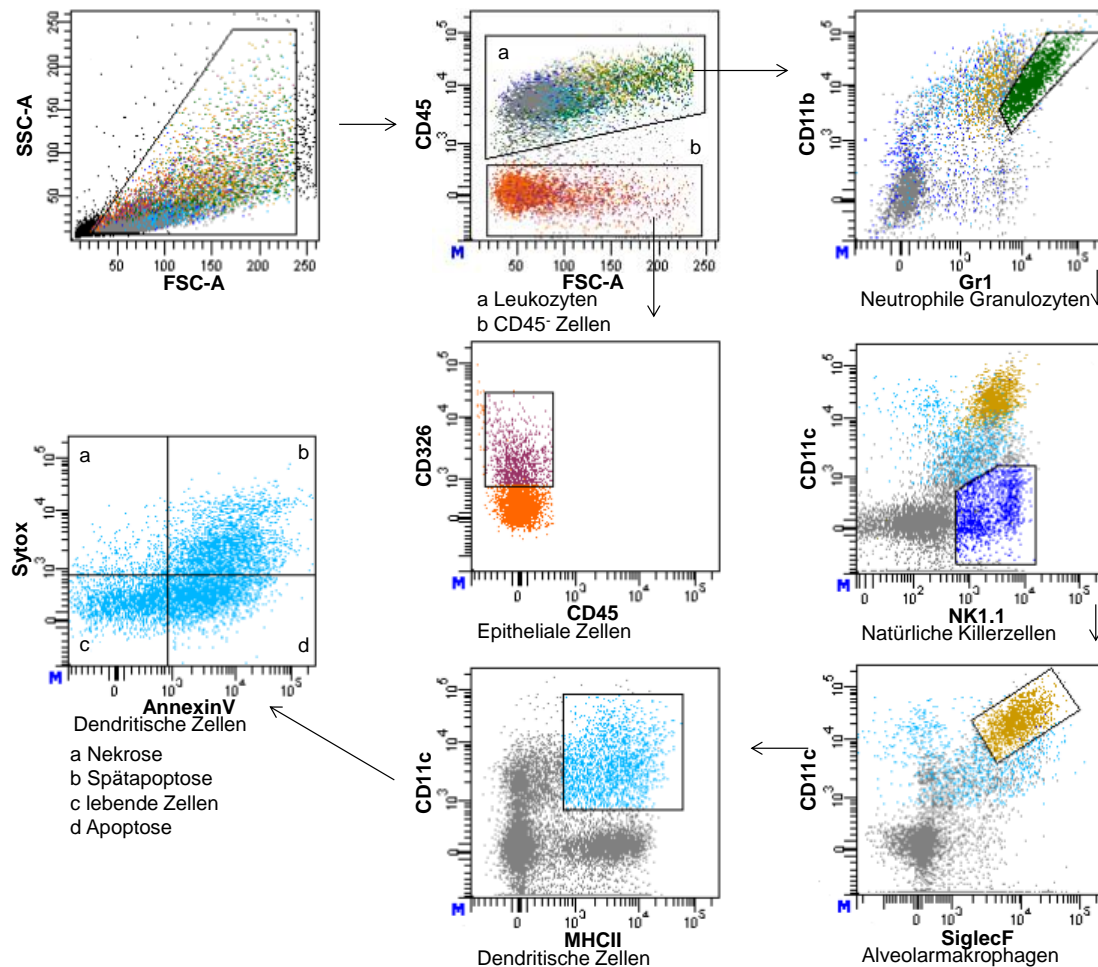


Abbildung 11: Gatingschema zur Bestimmung der Vitalität verschiedener Zelltypen

Nach Ausschluss der azellulären Bestandteile wurden zum einen die Leukozyten (CD45⁺) zum anderen die CD45⁻ Zellen erfasst. Aus den Leukozyten wurden die Populationen der neutrophilen Granulozyten (CD11b⁺Gr1⁺), der natürlichen Killerzellen (CD11c⁺NK1.1⁺), der Alveolarmakrophagen (CD11c⁺SiglecF⁺) und der gesamten dendritischen Zellen (CD11c⁺MHCII⁺) voneinander abgegrenzt, aus der Population der CD45⁻ Zellen wurden die epithelialen Zellen (CD326⁺) näher untersucht. Für diese Populationen wurde nun in einem Punktwolkendiagramm Sytox gegen Annexin-V angetragen.

2.2.4 Statistische Auswertung

Die in der Arbeit verwendeten Diagramme wurden mit der Software Graphpad Prism erstellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels eines one-way Anova tests, einzelne Gruppen wurden mit einem Tukey post test bzw. T- Test verglichen. Zur Darstellung wurden die Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwerts verwendet. Das Signifikanzniveau wurden mit * $p < 0,05$ definiert.

3 Ergebnisse

Ziel dieser Dissertation ist die Beleuchtung der postakuten Phase der Klebsiellenpneumonie. Alle Ergebnisse dieser Arbeit beziehen sich auf Tiere die an Tag fünf nach Induktion der Pneumonie untersucht wurden.

3.1 Analyse der verwendeten MSCs

Zur Kontrolle der verwendeten MSCs wurden diese durchflusszytometrisch analysiert. Hierbei wurden folgende Oberflächenmarker untersucht. Als wichtigste SCA-1, CD140a (PDGFR α) und CD45 nach denen die Zellen ursprünglich sortiert wurden. Hinzu kamen die Oberflächenmarker CD29, CD49e und CD105, CD90, Flk-1, VEGFR3, c-kit, CD150. Diese wurden mit dem Oberflächenprofil der von Morikawa et al. definierten Population verglichen. In den meisten Punkten entsprachen die verwendeten MSCs denen von Morikawa et al.

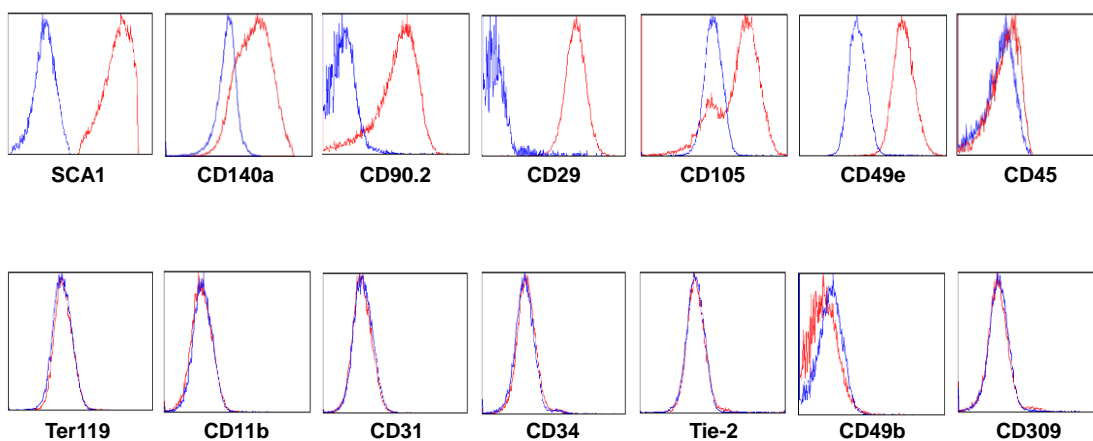


Abbildung 12: Repräsentative Histogramme der MSC Konsensusmarker

Rot Antikörper

Blau ISO- Typkontrolle

3.2 Analyse der bronchoalveolären Lavage

3.2.1 Bakterienlast der bronchoalveolären Lavage

Bei der Bestimmung der Bakterienlast zeigte sich bei beiden Messungen in BAL und Lungenhomogenat eine massive Reduktion der Bakterienlast in den mit MSCs behandelten Tieren gegenüber der Kpn/NaCl Gruppe.

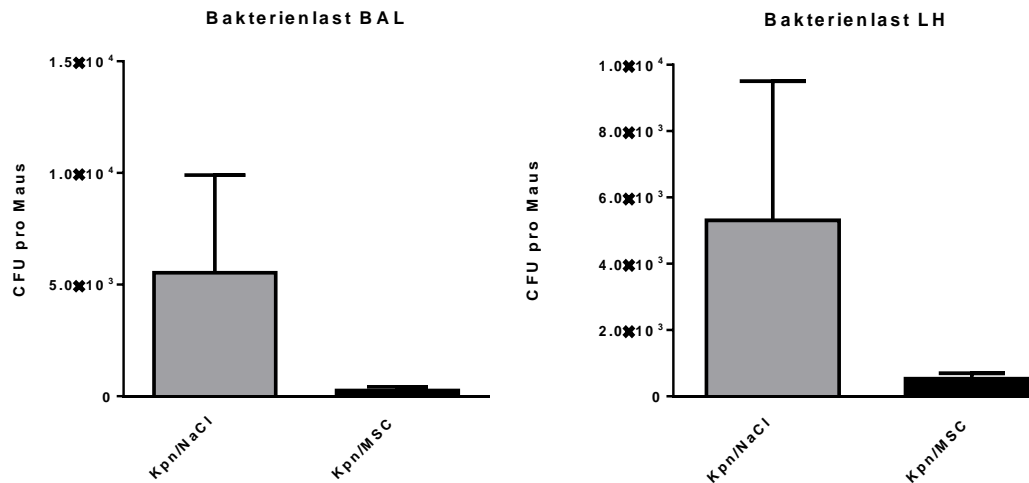


Abbildung 13: Bakterienlast in der BAL

Bestimmung nach 5 Tagen Klebsiella Pneumonie, Kontrollgruppe (NaCl), Kpn infizierte Tiere (Kpn/NaCl), Kpn infizierte Tiere mit MSC- Gabe (Kpn/MSC), ($n \geq 4$ bei Kpn/NaCl und Kpn/MSC, \pm Standardfehler)

3.2.2 Proteingehalt und Zellularität der bronchoalveolären Lavage

Die mit der Neubauerzählkammer ermittelte Zellzahl der bronchoalveolären Lavage zeigte einen massiven Anstieg der Zellularität in den infizierten Tieren gegenüber der Kontrollgruppe. Innerhalb der infizierten Gruppen ließen sich nur mäßige Unterschiede feststellen.

Die Analyse in der BAL befindlichen Proteine ergab einen Anstieg der Proteinkonzentration in den infizierten Gruppen gegenüber der Kontrollgruppe. Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der Proteindurchlässigkeit durch die Applikation von MSCs.

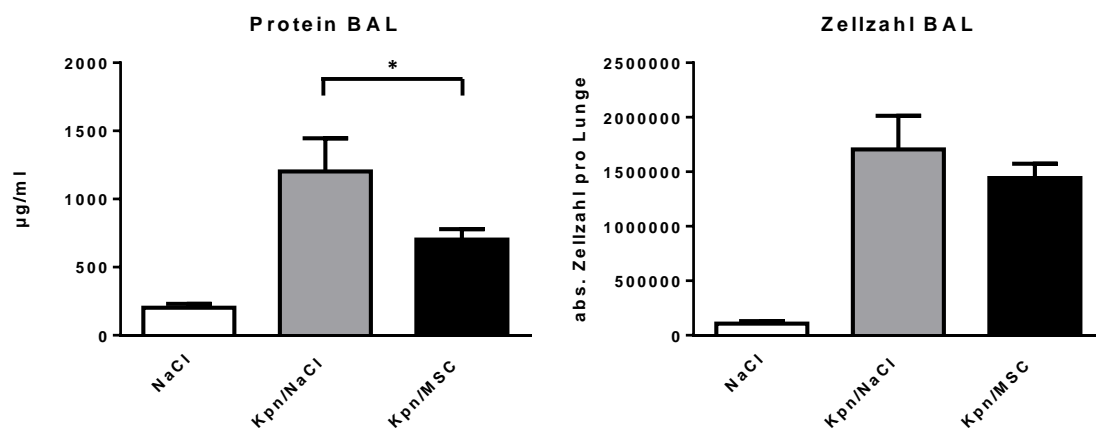


Abbildung 14: Zellzahl und Proteingehalt der BAL

Bestimmung nach 5 Tagen Klebsiella Pneumonie, Kontrollgruppe (NaCl), Kpn infizierte Tiere (Kpn/NaCl), Kpn infizierte Tiere mit MSC- Gabe (Kpn/MSC), (n≥4, ± Standardfehler)

3.3 Analyse der Zellpopulationen in der bronchoalveolären Lavage

Die durchflusszytometrische Analyse der BAL ergab eine starke Vermehrung der Granulozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen in den infizierten Gruppen. Die Tiere, denen nach Pneumonieinduktion MSCs appliziert wurden, zeigten eine um etwa 30% niedrigere Zunahme der dendritischen Zellen.

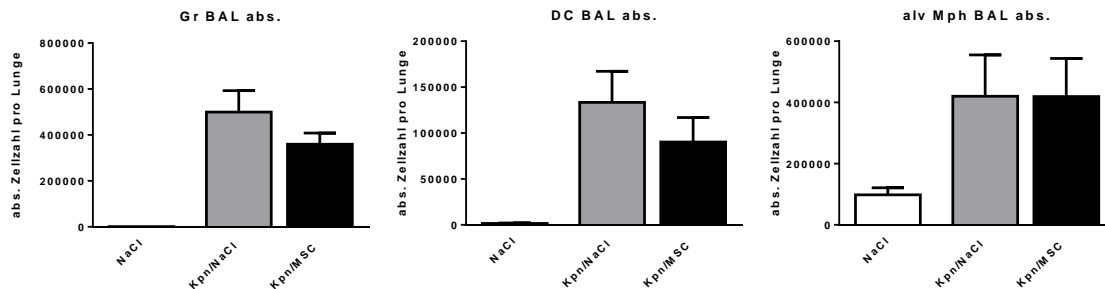


Abbildung 15: Granulozyten, Makrophagen und dendritische Zellen in der BAL
Bestimmung nach 5 Tagen Klebsiella Pneumonie, Kontrollgruppe (NaCl), Kpn infizierte Tiere (Kpn/NaCl), Kpn infizierte Tiere mit MSC- Gabe (Kpn/MSC), (n≥4, ± Standardfehler)

3.4 Analyse des Lungenhomogenats

3.4.1 Leukozytenpopulationen

Auch an Tag 5 der Klebsiella Pneumonie zeigte sich bei allen infizierten Tieren eine Leukozytose. Jedoch wurde eine Reduktion der Leukozytenzahl durch Applikation von MSCs festgestellt.

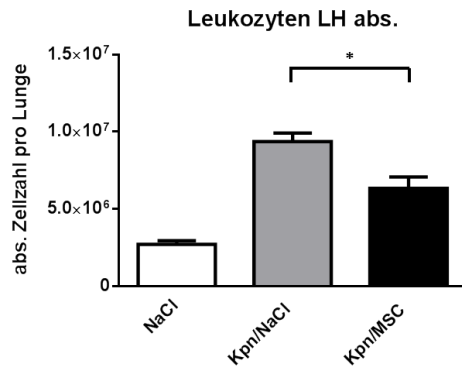


Abbildung 16: absolute Zellzahl im Lungenhomogenat

Bestimmung nach 5 Tagen Klebsiella Pneumonie, Kontrollgruppe (NaCl), Kpn infizierte Tiere (Kpn/NaCl), Kpn infizierte Tiere mit MSC- Gabe (Kpn/MSC), (n≥4, ± Standardfehler)

Vergleichbar mit den Ergebnissen der BAL kam es auch in der Lunge zu einer Zunahme von Makrophagen und dendritischen Zellen. Die Zunahme der neutrophilen Granulozyten und der dendritischen Zellen wurde hier durch die Gabe von MSCs gegenüber der Kpn/NaCl Gruppe signifikant gehemmt.

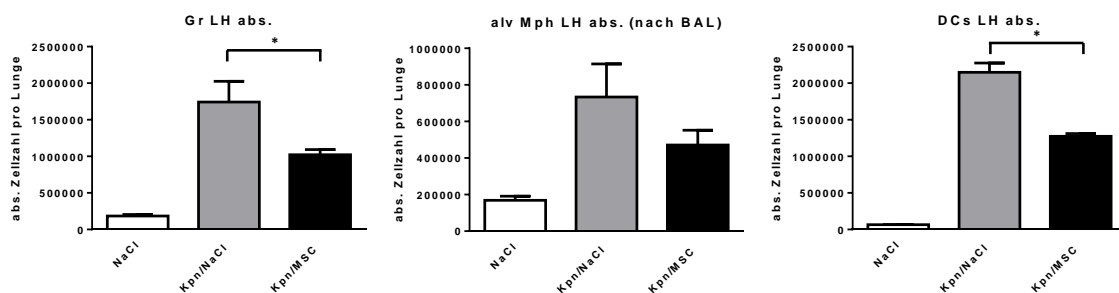


Abbildung 17: Granulozyten, Makrophagen und dendritische Zellen im Lungenhomogenat

Bestimmung nach 5 Tagen Klebsiella Pneumonie, Kontrollgruppe (NaCl), Kpn infizierte Tiere (Kpn/NaCl), Kpn infizierte Tiere mit MSC- Gabe (Kpn/MSC), (n≥4, ± Standardfehler)

3.4.1.1 Subtypen der dendritischen Zellen

Bei der Analyse der Subtypen der dendritischen Zellen wurde zwischen plasmazytoiden dendritischen Zellen, CD103⁺ dendritischen und CD11b⁺ dendritischen Zellen unterschieden. Aufgrund der Pneumonie bedingten Leukozytose in der Lunge waren alle diese Subtypen in den infizierten Tieren gegenüber der Kontrollgruppe erhöht. Alle untersuchten Subpopulationen zeigten signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen mit und ohne MSC Behandlung auf.

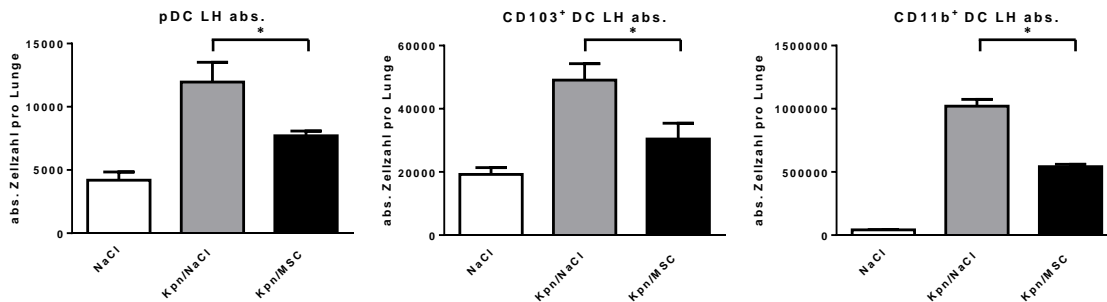


Abbildung 18: Subpopulationen der dendritischen Zellen im Lungenhomogenat
Bestimmung nach 5 Tagen Klebsiella Pneumonie, Kontrollgruppe (NaCl), Kpn infizierte Tiere (Kpn/NaCl), Kpn infizierte Tiere mit MSC- Gabe (Kpn/MSC), (n≥4, ± Standardfehler)

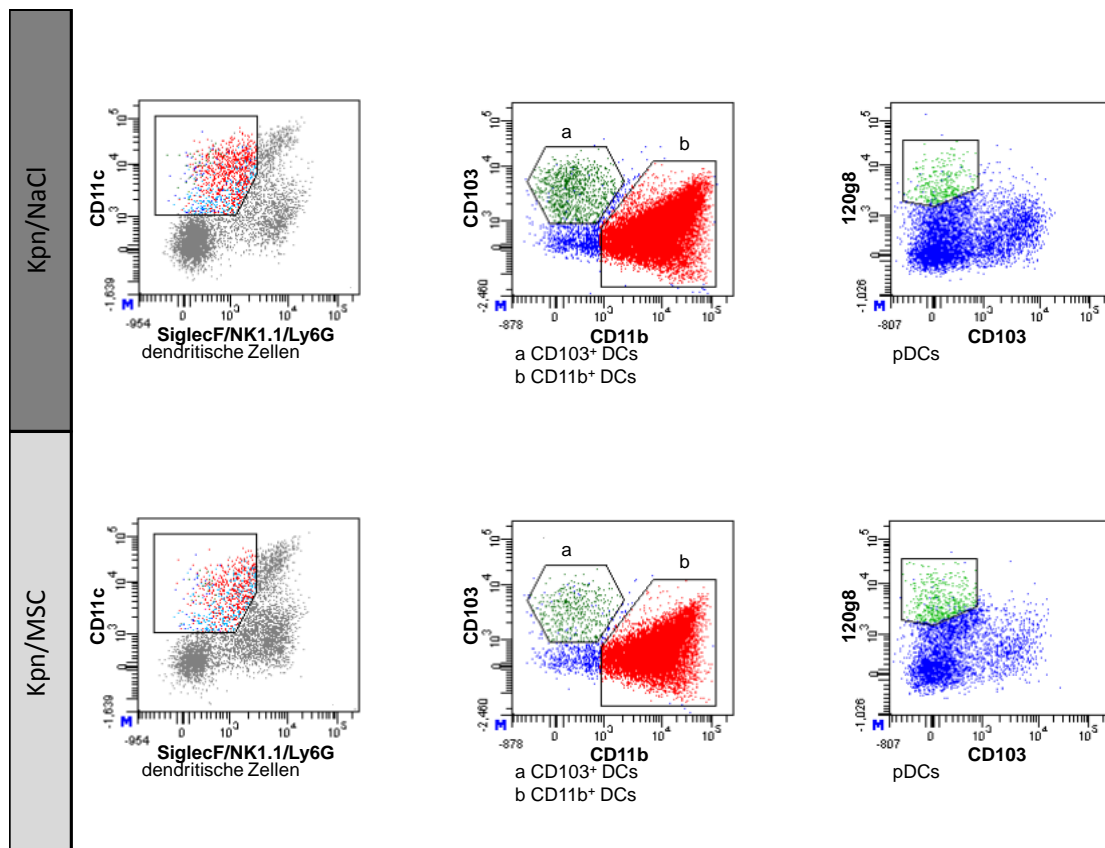


Abbildung 19: Repräsentative Punktwolkendiagramme der DC- Subtypen im Lungenhomogenat

Gating nach der entsprechenden oben genannten Gatingstrategie

3.4.2 Modulation von Aktivierungsmarkern auf den DC- Subtypen

Um Aussagen über den Reife und Aktivierungszustand der einzelnen DC- Subtypen treffen zu können wurden die Aktivierungsmarker CD86 und CD274 bestimmt. CD86 wird bei entzündlichen Vorgängen hochreguliert und ist wichtigster Kostimulator bei der T-Zellaktivierung (Mukherjee et al. 2002). CD274 ist ein immunregulatorisches Molekül und auch unter dem Namen *programmed celldeath ligand 1* (PD-L1) bekannt. Es unterdrückt kostimulatorischen die Aktivierung von T-Zellen (Gianchecchi et al. 2013) und schwächt so die Immunantwort. Zudem wurde die Expression von MHCII in den DC- Subtypen gemessen.

Die Analyse dieser Oberflächenmarker erfolgte mittels der MFI - der mittleren Fluoreszenzintensität. Die Expression von CD86 und MHCII wurde in keiner der analysierten Populationen durch die Anwesenheit von MSCs beeinflusst. Die Expression von CD274 wurde durch die Applikation von MSCs in der Population der pDCs massiv und in der der CD11b⁺ DC mäßig gesteigert.

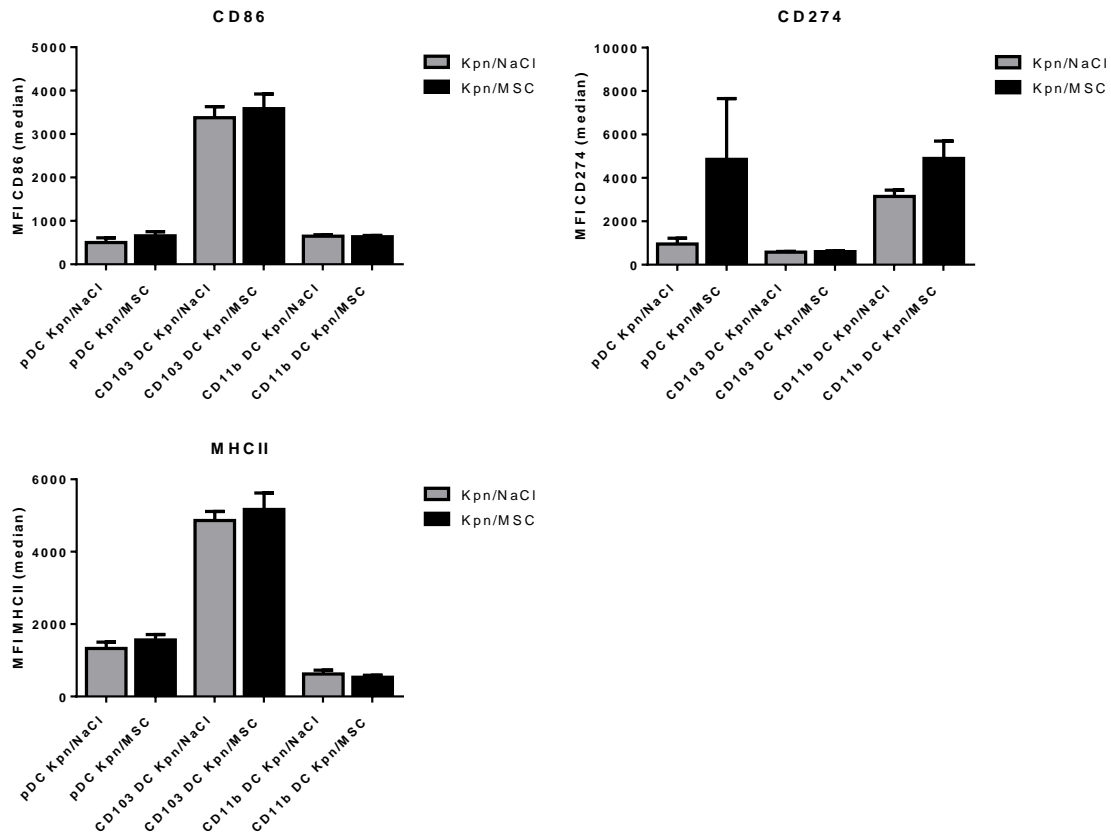


Abbildung 20: Aktivierungsmarkerexpression der DC- Subtypen

Bestimmung nach 5 Tagen Klebsiella Pneumonie, Kontrollgruppe (NaCl), Kpn infizierte Tiere (Kpn/NaCl), Kpn infizierte Tiere mit MSC- Gabe (Kpn/MSC), (n≥4, ± Standardfehler)

3.5 Analyse der lymphozytären Populationen in der Lunge

In der postakuten Phase der Klebsiella Pneumonie kommt es zu einer relativen Lymphozytopenie, da aber eine starke Leukozytose vorliegt ist eine absolute Vergrößerung der Lymphozytenpopulationen zu beobachten. Die Erhöhung der Zahl der T- Lymphozyten und ihrer Subpopulation den $CD4^+$ T-Zellen war bei den MSC behandelten Tieren signifikant schwächer ausgeprägt. Auch in der Population der $CD8^+$ T-Zellen sowie der $gdTCR^+$ Zellen war dieser Effekt zu beobachten. Die B-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen waren im Vergleich zur Kontrollgruppe in verminderter Zahl vorhanden.

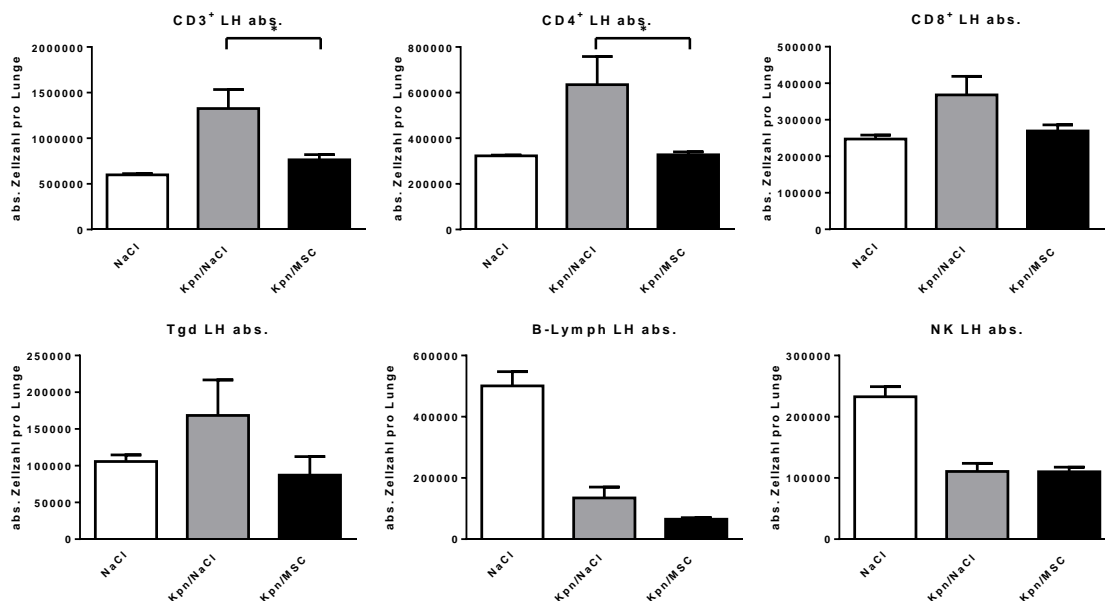


Abbildung 21: Lymphatische Subpopulationen

Bestimmung nach 5 Tagen Klebsiella Pneumonie, Kontrollgruppe (NaCl), Kpn infizierte Tiere (Kpn/NaCl), Kpn infizierte Tiere mit MSC- Gabe (Kpn/MSC), ($n \geq 4$, \pm Standardfehler)

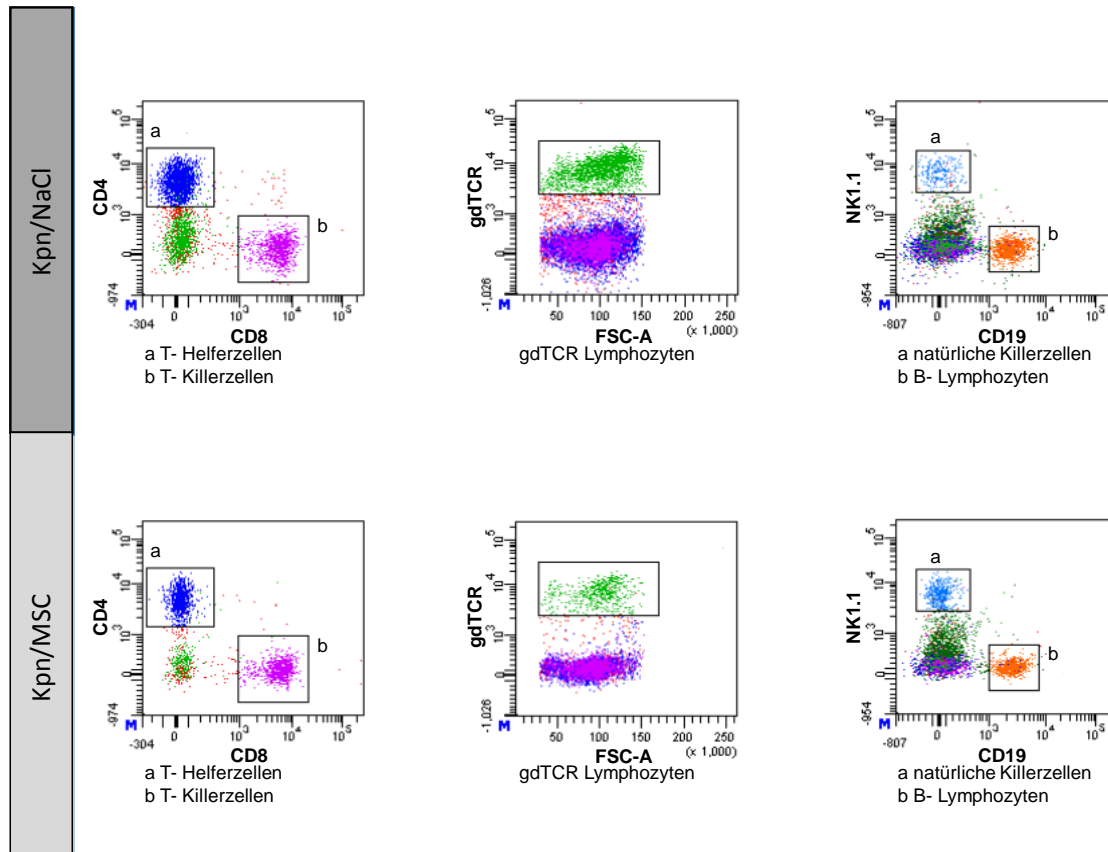


Abbildung 22: Repräsentative Punktwolkendiagramme der Lymphozytenpopulationen im Lungenhomogenat
Gating nach der entsprechenden oben genannten Gatingstrategie

3.5.1 Analyse regulatorischer T- Zellen in der Lunge

Die Analyse der regulatorischen T- Zellen in der Lunge ergab keine Unterschiede zwischen den infizierten Gruppen von Tieren.

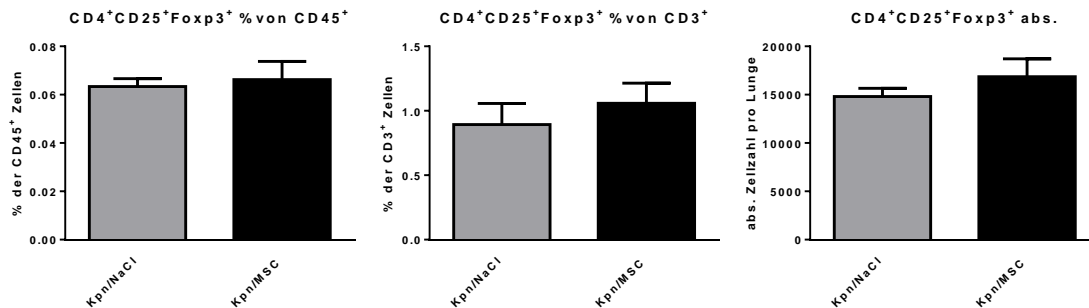


Abbildung 23: regulatorische T-Zellen

Bestimmung nach 5 Tagen Klebsiella Pneumonie, Kpn infizierte Tiere (Kpn/NaCl), Kpn infizierte Tiere mit MSC- Gabe (Kpn/MSC), (n≥4, ± Standardfehler)

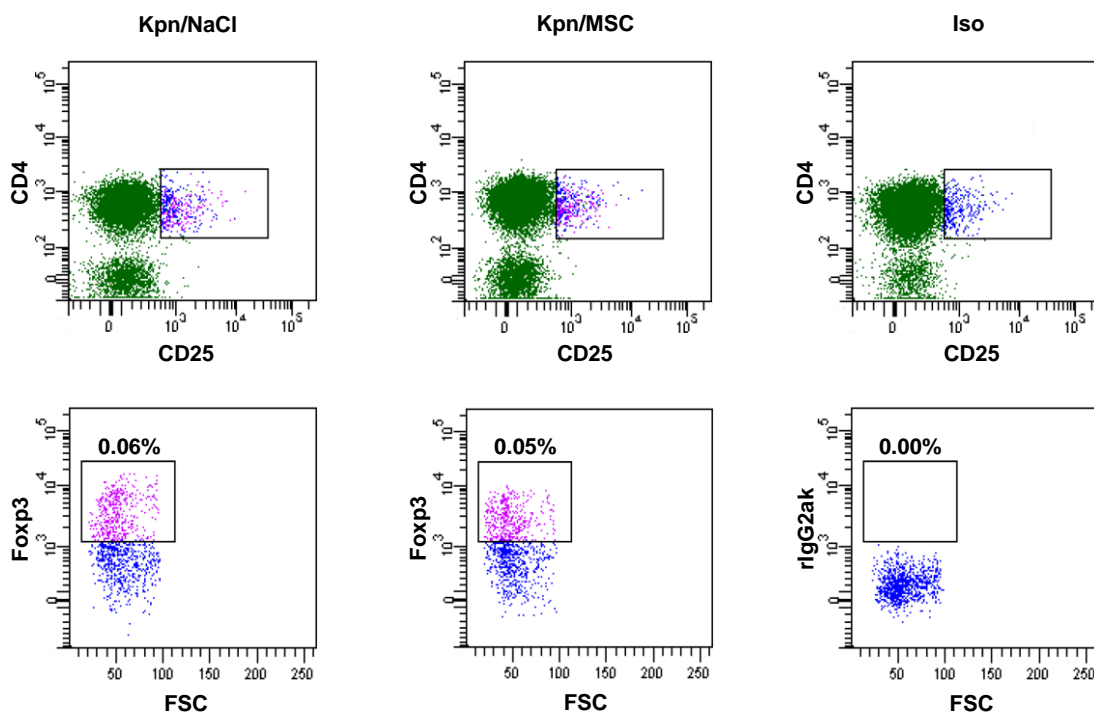


Abbildung 24: Repräsentative Punktwolkendiagramme der regulatorischen T-Zellen

Gating nach der entsprechenden oben genannten Gatingstrategie

3.6 Analyse der Zytokinproduktion der T- Zellen

Zur durchflusszytometrischen Bestimmung der produzierten Zytokine wurden diese intrazellulär gefärbt. Es wurden die Zytokine Interferon- γ , Interleukin-4, Interleukin-10 und Interleukin-17 gemessen. Es kam sowohl bei den CD4⁺ T-Zellen als auch bei den CD8⁺ T-Zellen zu einem massiven Anstieg der Produktion von IFN- γ im Vergleich zur Isotypkontrolle. Wobei diese Steigerung durch die Behandlung mit MSCs abgeschwächt wurde. Als signifikant stellte sich dieser Effekt sowohl bei relativen als auch bei der absoluten Anzahl von IFN- γ und IL-17 produzierenden CD4⁺ T-Zellen dar.

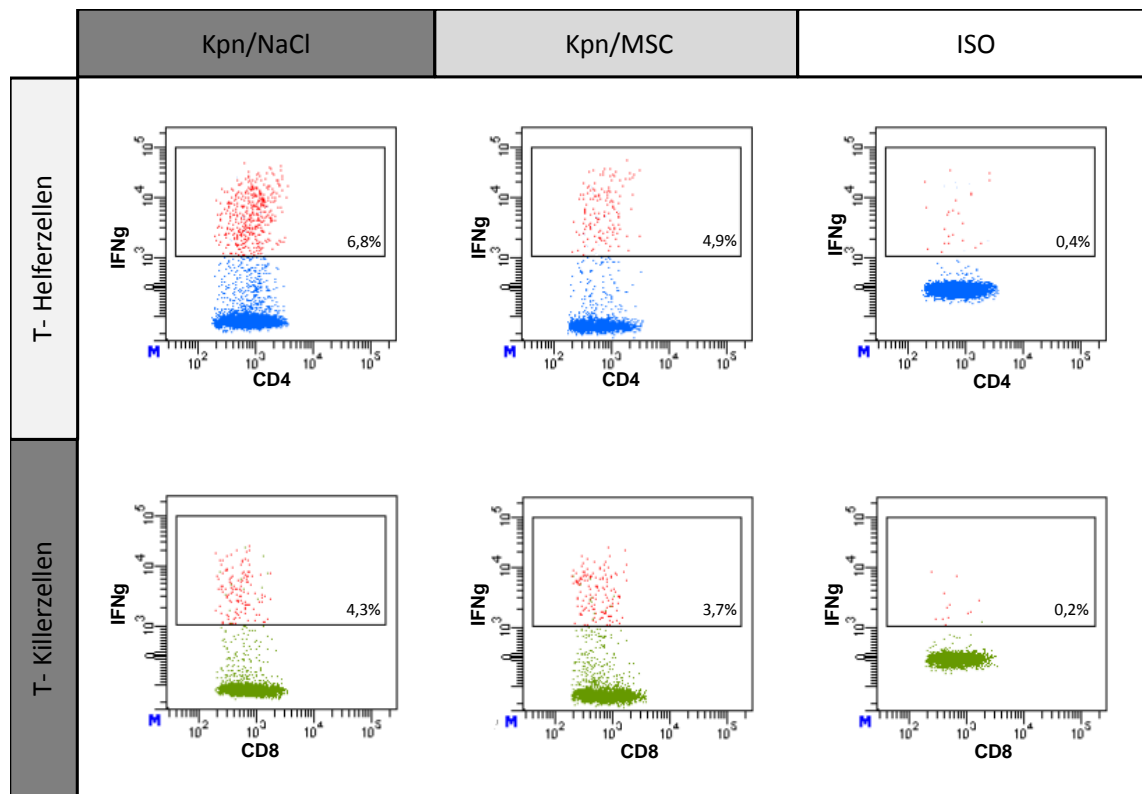


Abbildung 25: Repräsentative Punktwolkendiagramme der Produktion von IFN- γ in CD4⁺ T-Zellen und CD8⁺ T-Zellen

Gating nach der entsprechenden oben genannten Gatingstrategie

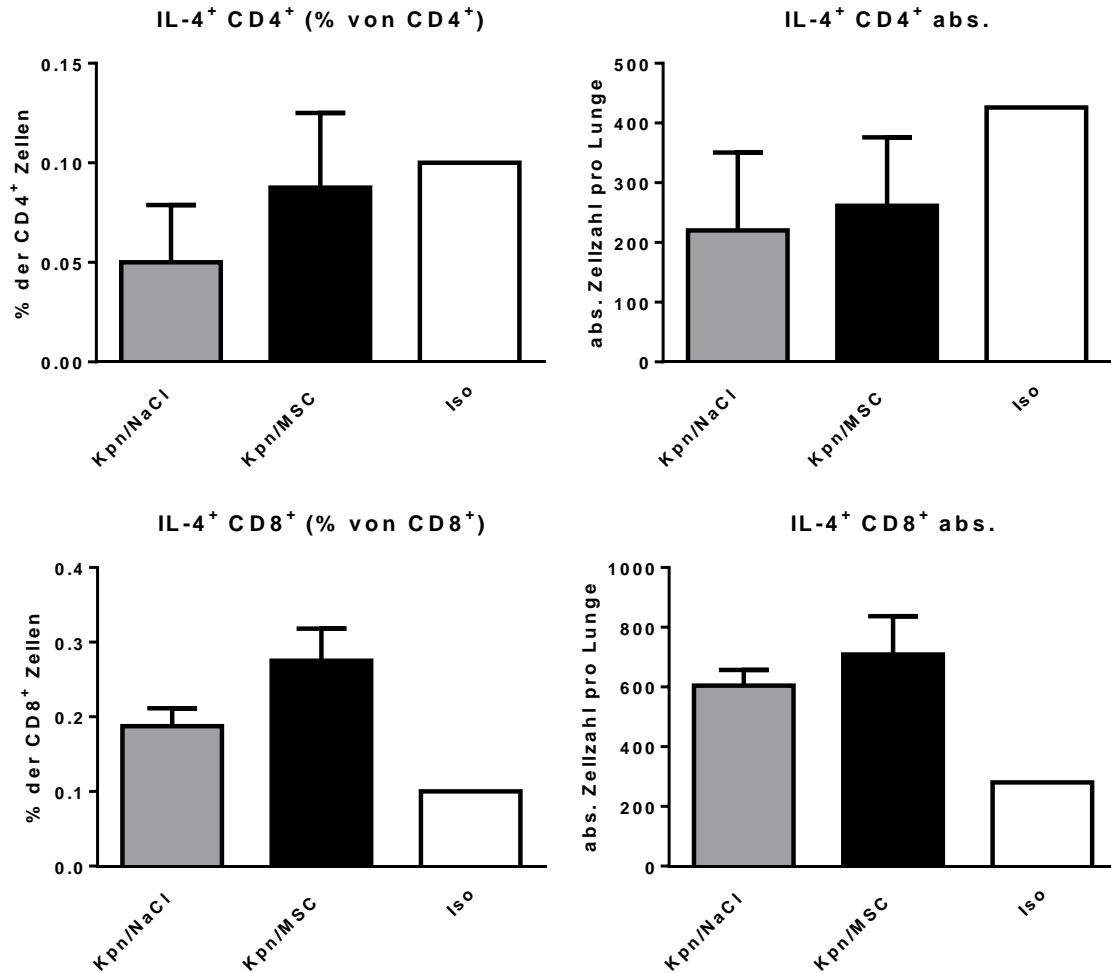


Abbildung 26: Produktion von IL-4 in CD4⁺ T-Zellen und CD8⁺ T-Zellen

Bestimmung nach 5 Tagen Klebsiella Pneumonie, Kontrollgruppe (NaCl), Kpn infizierte Tiere (Kpn/NaCl), Kpn infizierte Tiere mit MSC- Gabe (Kpn/MSC), (n≥4 in Kpn/NaCl und Kpn/MSC, ± Standardfehler)

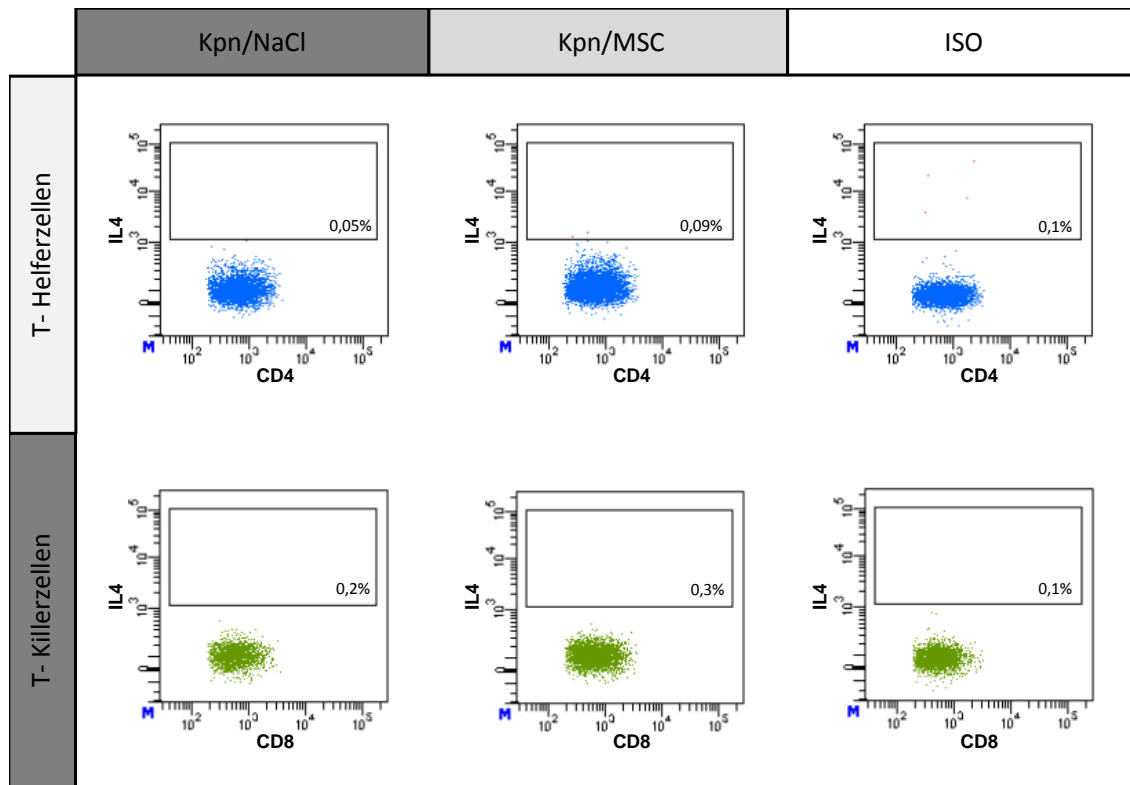


Abbildung 27: Repräsentative Punktwolkendiagramme der Produktion von IL-4 in CD4+ T-Zellen und CD8+ T-Zellen

Gating nach der entsprechenden oben genannten Gatingstrategie

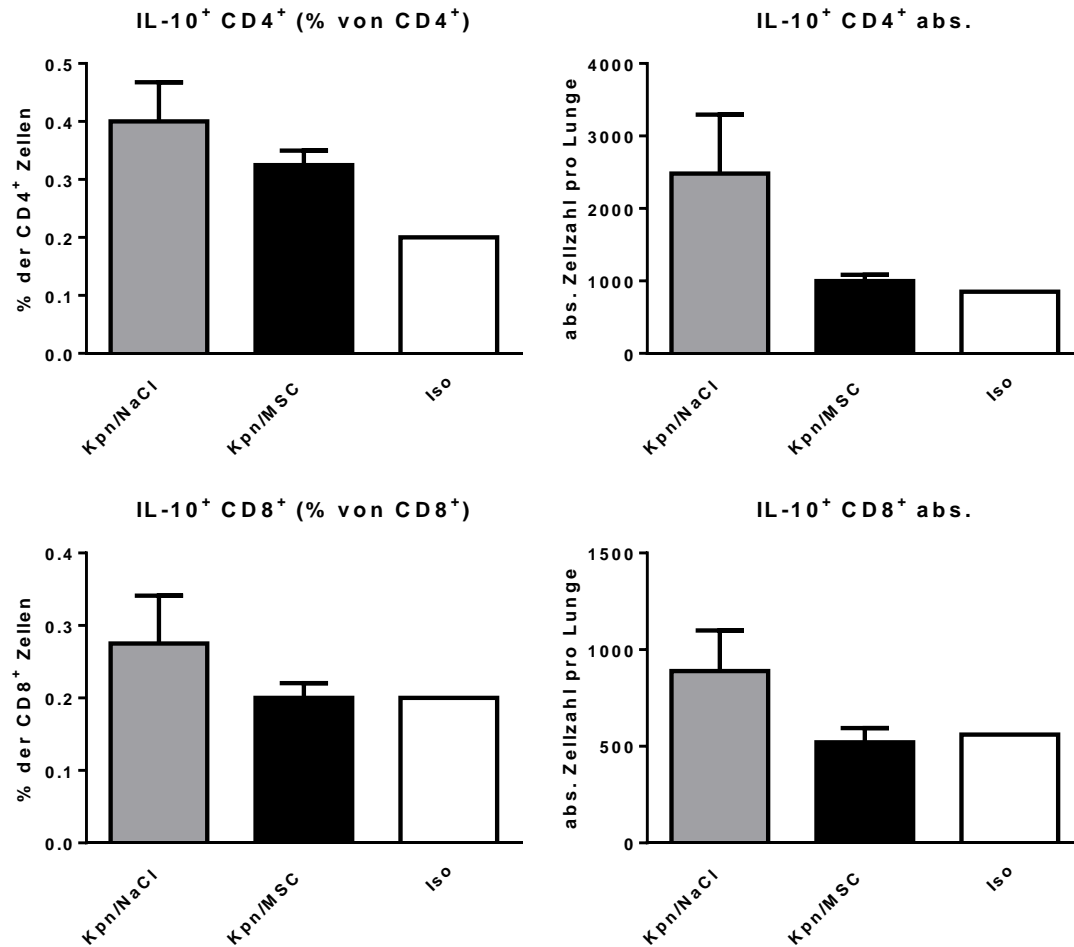


Abbildung 28: Produktion von IL-10 in CD4⁺ T-Zellen und CD8⁺ T-Zellen

Bestimmung nach 5 Tagen Klebsiella Pneumonie, Kontrollgruppe (NaCl), Kpn infizierte Tiere (Kpn/NaCl), Kpn infizierte Tiere mit MSC- Gabe (Kpn/MSC), (n≥4 in Kpn/NaCl und Kpn/MSC, ± Standardfehler)

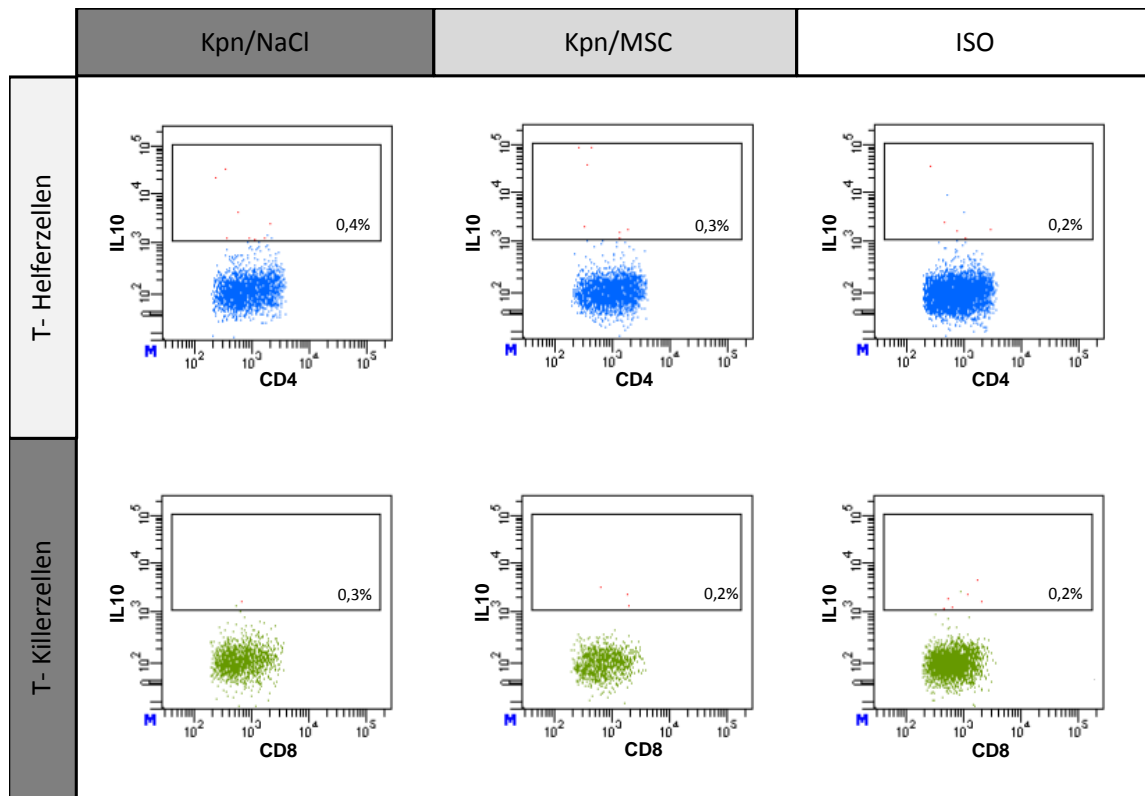


Abbildung 29: Repräsentative Punktwolkendiagramme der Produktion von IL-10 in CD4+ T-Zellen und CD8+ T-Zellen

Gating nach der entsprechenden oben genannten Gatingstrategie

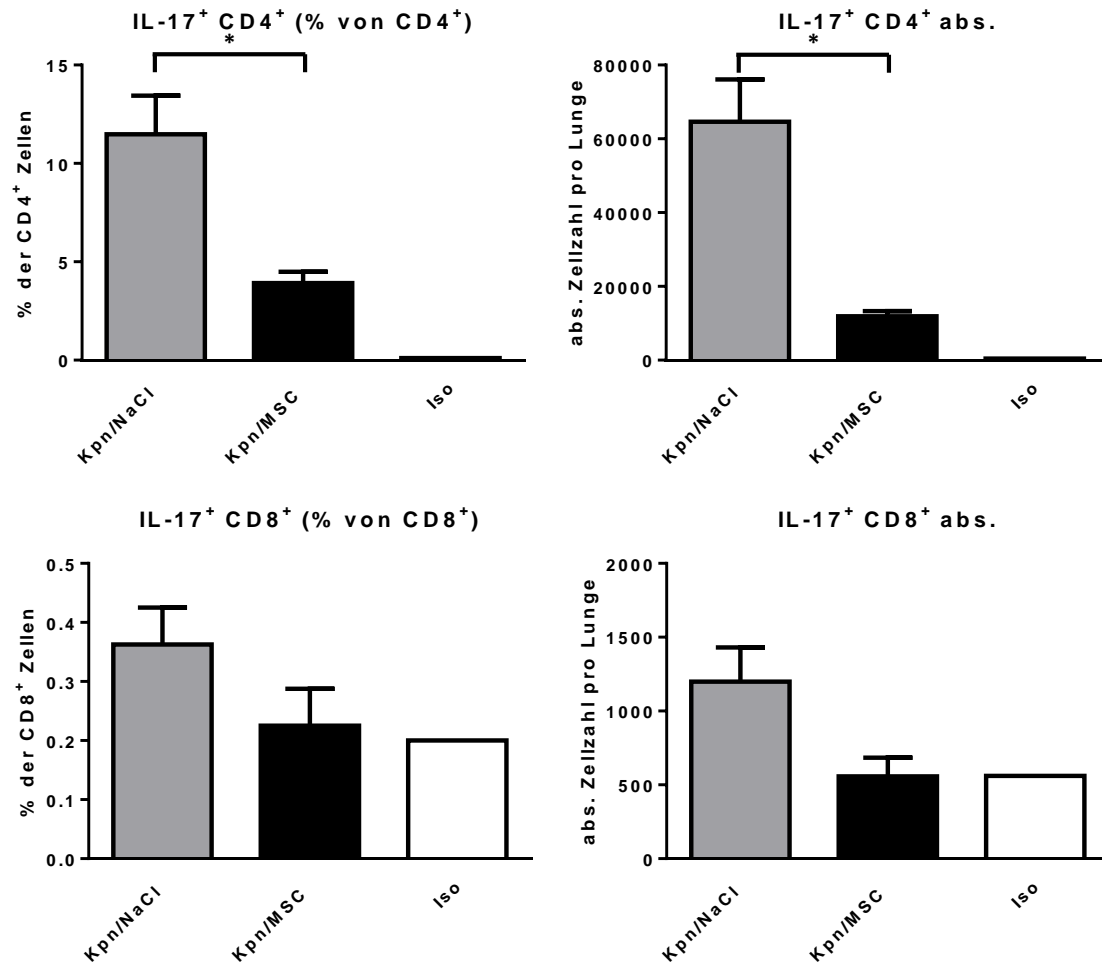


Abbildung 30: Produktion von IL-17 in CD4⁺ T- Zellen und CD8⁺ T- Zellen

Bestimmung nach 5 Tagen Klebsiella Pneumonie, Kontrollgruppe (NaCl), Kpn infizierte Tiere (Kpn/NaCl), Kpn infizierte Tiere mit MSC- Gabe (Kpn/MSC), (n≥4 in Kpn/NaCl und Kpn/MSC, ± Standardfehler)

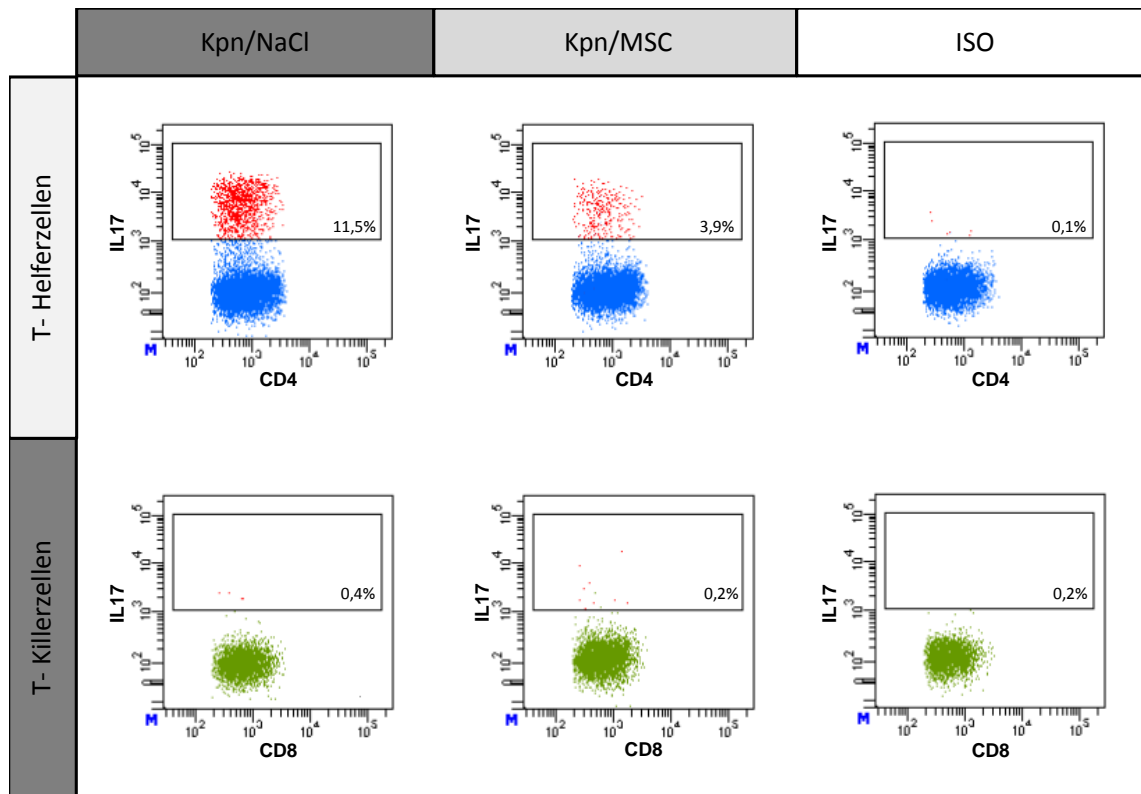


Abbildung 31: Repräsentative Punktwolkendiagramme der Produktion von IL-17 in CD4+ T-Zellen und CD8+ T-Zellen

Gating nach der entsprechenden oben genannten Gatingstrategie

3.7 Analyse der Bindung von Annexin-V zur Bestimmung der Vitalität verschiedener Zelltypen

Die Bestimmung von Annexin-V zum Vergleich der Vitalität verschiedener Zelltypen zwischen Mäusen mit und ohne MSC-Behandlung erbrachte keine signifikanten Unterschiede. Bei der Population der epithelialen Zellen war eine Reduktion der Annexin-V Bindung durch die Gabe von MSCs zu beobachten.

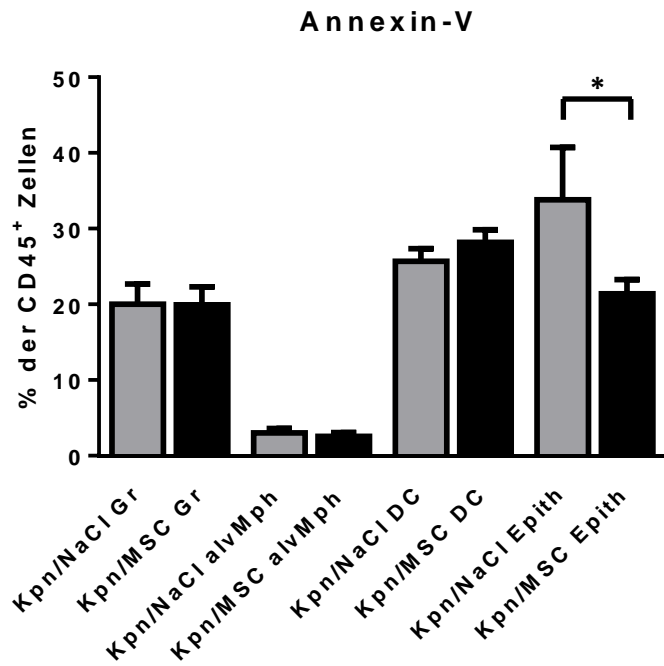


Abbildung 32: Apoptose Analyse mittels Annexin-V

Bestimmung nach 5 Tagen Klebsiella Pneumonie, Kontrollgruppe (NaCl), Kpn infizierte Tiere (Kpn/NaCl), Kpn infizierte Tiere mit MSC- Gabe (Kpn/MSc), (n≥4 in Kpn/NaCl und Kpn/MSc, ± Standardfehler)

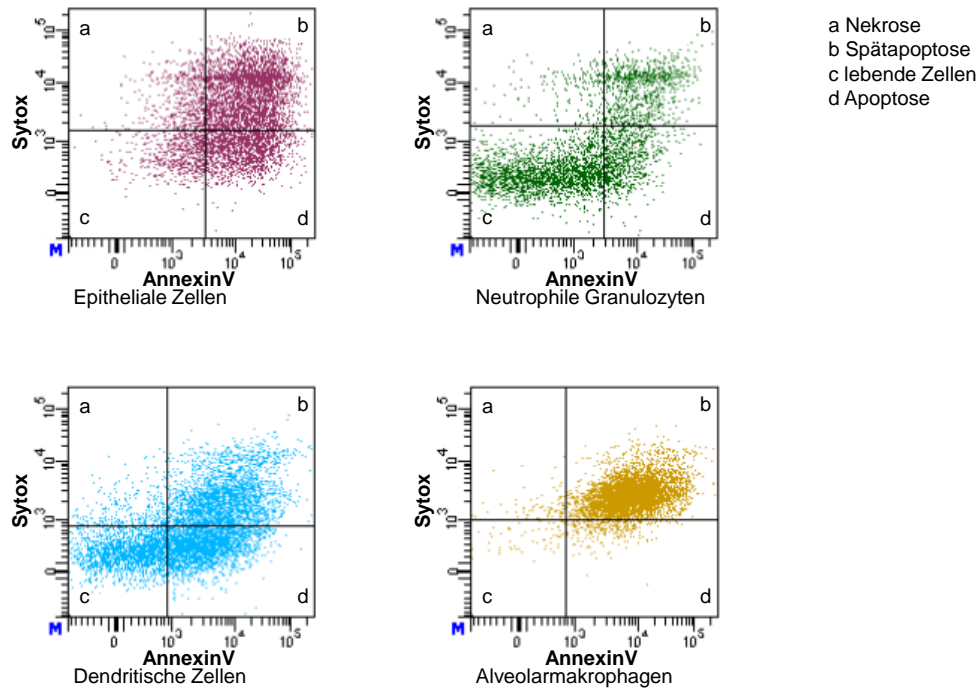


Abbildung 33: repräsentative Bindungsverhalten von Annexin-V an verschiedene Zelltypen

Nach oben genannter Gatingstrategie wurden die Bindung von Annexin-V und die Färbung von Sytox bei epithelialen Zellen, neutrophilen Granulozyten dendritischen Zellen und Alveolarmakrophagen verglichen.

4 Diskussion

Ziel dieser Dissertation ist die immunologische Beschreibung des postakuten Intervalls einer Klebsiellen Pneumonie im Mausmodell. Im verwendeten Modell ist das maximale Ausmaß der Pneumonie an Tag zwei nach Infektion erreicht. Dies lässt sich durch klinische Daten anderer Versuche der Arbeitsgruppe Prof. Hackstein belegen (Hackstein et al. 2015). Im Fokus dieser Dissertation steht jedoch das postakute Intervall mit einer Auswertung an Tag fünf. Zwar ist die Leukozytose zu diesem Zeitpunkt weniger stark ausgeprägt als in der akuten Phase, sie ist jedoch immer noch signifikant vorhanden und deshalb Nachweis einer bis zu Tag fünf fortbestehenden Infektion.

4.1 Verwendung von prospektiv definierten MSCs

Die Mehrzahl der Arbeiten zu MSCs verwenden Kulturen von heterogenen Stammzellen, die aufgrund ihrer Plastikadhärenz selektiert wurden und somit nur eingeschränkt vergleichbare Ergebnisse liefern (Dominici et al. 2006). Die in den Versuchen für diese Dissertation verwendeten MSCs zeichnen sich durch ihre prospektive Definition analog zur Veröffentlichung von Morikawa et al. aus (Morikawa et al. 2009): Nach ihrer Sortierung und Kultivierung wurden die MSCs durchflusszytometrisch analysiert und zeigten in entscheidenden Punkten ein, zu dem von Morikawa et al. beschriebenen, identisches Oberflächenprofil. Diese prospektive Definition von MSCs erleichtert die Schaffung von standardisierten Kultivierungsprotokollen und ermöglicht eine verbesserte Vergleichbarkeit verschiedener MSC Studien (Mabuchi et al. 2013). In den für diese Dissertation durchgeführten Versuchen wurden prospektiv sortierte MSCs verwendet, somit sind die Ergebnisse dieser Versuche besonders gut mit anderen MSC Studien vergleichbar.

4.2 Wirkprinzipien der MSCs während einer Pneumonie

Durch die Applikation von MSCs konnte sowohl in der akuten als auch in der subakuten Phase der Pneumonie ein abgeschwächter Verlauf der Erkrankung erreicht werden. Es kam 1. zu einer Abnahme der Sterblichkeit, 2. zu einer Minderung der Proteinkonzentration in der bronchoalveolären Lavage, 3. zu einer Abnahme der Leukozytose sowie 4. einer Reduktion der Bakterienlast. Viele dieser Aspekte lassen sich durch die bereits in der Einleitung dieser Dissertation beschriebenen immunmodulatorischen Effekte der MSCs erklären. Hierbei stehen die schon länger bekannten immunsuppressiven Qualitäten der MSCs im Vordergrund. Dies lässt sich

durch das stark inflammatorische Milieu begründen, in das die MSCs appliziert wurden. Letztlich sind viele immunsuppressive Effekte der MSCs an das Vorhandensein von proinflammatorischen Zytokinen gebunden (Polchert et al. 2008; Corcione et al. 2006). Im Gegensatz dazu wurden die immunstimulatorischen Effekte in neutralen bzw. durch Autoimmunerkrankungen oder chronischen Entzündungen beeinflussten Milieus beobachtet (Dazzi und Krampera 2011).

4.3 Untersuchung der bronchoalveolären Lavage

4.3.1 Reduktion der Proteinkonzentration in der BAL

Wie bereits in der Einleitung dieser Dissertation beschrieben, stellt die überschießende Reaktion des Immunsystems auf die Pneumonie die größte Belastung für das Lungenparenchym dar (Harrisons 2012). Dieser fulminante Verlauf kann im Sinne eines *acute respiratory distress syndrome* (ARDS) mit erheblichen Schäden des Lungengewebes einhergehen. Die Bestimmung des Proteingehalts in der bronchoalveolären Lavage (BAL) lässt Rückschlüsse auf die Steigerung der Permeabilität der Blut-Luftschranke zu. Diese wird durch den Untergang von Pneumozyten gesteigert (Harrisons 2012).

Verschiedene Studien haben die Auswirkungen von MSCs auf ein ARDS unterschiedlicher Genese untersucht (Rojas et al. 2005; Gupta et al. 2007): Nach der Gabe von *Escherichia coli*-Toxin zeigte sich eine höhere Überlebensrate bei den MSC behandelten Tieren, wie auch eine Abmilderung des Lungenparenchymschadens. Dies lässt sich rückführen auf eine Reduktion des Lungenödems und der Proteinkonzentration in der bronchoalveolären Lavage (Gupta et al. 2007). Auch durch Bleomycin verursachte Schäden an der Lunge konnten durch die Gabe von MSCs abgemildert werden (Rojas et al. 2005). In den Versuchen für diese Dissertation zeigte sich für die Tiere, die MSCs erhielten, eine signifikant geringere Proteinkonzentration in der BAL (Hackstein et al. 2015). Somit wurde bestätigt, dass MSCs auch in einem durch lebendige Bakterien induzierten ARDS protektiv wirken. Diese Tatsache wird durch Gupta et al. untermauert, die in einem ähnlichen Mausmodel mit *E. coli* zu vergleichbaren Ergebnissen kamen (Gupta et al. 2012). Somit konnten die Erkenntnisse dieser Studien zur Wirkung von MSCs in einer bakteriellen Pneumonie erweitert werden. Zum einen lässt sich die geringere Proteinkonzentration in der BAL mit einer regulatorischen Komponente der MSC-Aktivität auf das Immunsystem erklären. Die Hemmung der Immunantwort führt konsekutiv zu einer weniger überschießenden Immunreaktion und somit zu einer Reduktion des Ausmaßes der

Epithel- und Endothelschädigung. Zum anderen sind MSCs in der Lage Angiopoetin-1 zu sezernieren, welches einen stabilisierenden Effekt auf die Blut-Luftschranke hat und ihre Integrität erhält (Mei et al. 2007).

4.3.2 Reduktion der Bakterienlast in der BAL

Ein wichtiger Gesichtspunkt um das Ausmaß einer Pneumonie abzuschätzen, ist die bakterielle Keimlast. Je mehr Pathogenen die Lunge ausgesetzt ist, desto ausgeprägter verläuft auch die immunologische Antwort. Durch die Gabe von MSCs konnte die Bakterienlast im angewendeten Pneumoniemodell reduziert werden. Jedoch war dieses Ergebnis aufgrund großer interindividueller Unterschiede nicht signifikant.

Dieser entscheidende Faktor kann nicht mit der immunsuppressiven Wirkung von MSCs im inflammatorischen Umfeld erklärt werden. In einem immunsupprimierten Milieu wäre eine stärkere Ausbreitung der Bakterien zu erwarten (Lee et al. 2013), wie diese bei Patienten mit geschwächtem Immunsystem zu beobachten ist.

Neue Erkenntnisse von Krasnodembskaya, Gupta, Lee und Kollegen legen nahe, dass MSCs nicht nur über Modulation der Immunantwort den Verlauf einer Pneumonie beeinflussen, sondern auch direkt über die Ausschüttung von löslichen Faktoren die innate Immunantwort unterstützen (Krasnodembskaya et al. 2010; Lee et al. 2013; Gupta et al. 2012). Der Fokus der Arbeit von Krasnodembskaya lag auf dem Peptid LL-37, das der Familie der Cathelicidine angehört. Diese Peptide werden hauptsächlich von neutrophilen Granulozyten, aber auch durch verschiedene Zellen der innate Immunabwehr nach der Stimulation durch Pathogene, wie Makrophagen produziert und wirken antimikrobiell. In einer akuten Entzündungssituation schütten humane MSCs LL-37 aus (Krasnodembskaya et al. 2010). Dies wurde in vitro durch die Stimulation mit *E. coli* haltigem Substrat bestätigt (Krasnodembskaya et al. 2010). Dabei wurde in einem Mausmodell, ähnlich dem in dieser Dissertation in einer *E. coli* Pneumonie eine Reduktion der Bakterienlast festgestellt (Krasnodembskaya et al. 2010). Hierbei wurde eine erhöhte Sezernierung von LL-37 durch die applizierten MSCs beobachtet, die durch die Vorbehandlung mit einem Anti LL-37 Antikörper partiell reversibel war. Durch die Vorbehandlung der MSCs konnte ihre LL-37 Produktion verifiziert werden (Krasnodembskaya et al. 2010). In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass LL-37 in vitro einen breitgefächerten antimikrobiellen Effekt aufweist (López-García et al. 2005). Die antimikrobielle Wirksamkeit von LL-37 speziell auch bei *Klebsiella pneumoniae* Infektionen wurden durch Smeianov et al. untersucht und bestätigt (Smeianov et al. 2000).

In einer weiteren Studie der Arbeitsgruppe Gupta, Krasnodembskaya und Kollegen wurde Lipocalin 2 als ein weiteres Protein gefunden, welches einen wesentlichen Einfluss auf die antibakterielle Wirkung von MSCs nimmt. Lipocalin 2 schränkt den Eisenstoffwechsel der Bakterien ein (Gupta et al. 2012).

Lee et al. haben die Wirkung von MSCs in einem ex vivo Modell an humanen Lungen in einer *E. coli* Pneumonie mit lebendigen Bakterien untersucht. Es wurde festgestellt, dass durch die Applikation von MSCs die Bakterienlast gesenkt werden konnte. Auch die in einer Pneumonie eingeschränkte Fähigkeit zur alveolären Flüssigkeitsresorption AFC (*alveolar fluid clearance*) konnte durch die Gabe von MSCs verbessert werden (Lee et al. 2013). Zudem wurde festgestellt, dass die intrabronchiale Gabe von MSCs die Phagozytoseleistung von Makrophagen steigert. In einer vorhergehenden Arbeit stellten Lee et al. einen Zusammenhang zwischen der antimikrobiellen Wirksamkeit von MSCs und dem Keratinozyten- Wachstumsfaktor KGF (*keratinocyte growth factor*) her, welcher von MSCs produziert wird (Lee et al. 2009). Nun wurde in beschriebenen Versuchsaufbau die intrabronchiale Gabe von MSCs durch die von KGF ersetzt, dies hatte genauso effektive Auswirkungen auf die Bakterienlast und die AFC (Lee et al. 2013). Ein Zusatz von KGF-Antikörper zur MSC Gabe konnte ihre antibakterielle Wirkung stark vermindern (Lee et al. 2013). Weitere in vitro Versuche von Lee et al. ergaben, dass humane Monozyten Rezeptoren für KGF besitzen. Durch die direkte Stimulation von Monozyten durch KGF bzw. durch MSCs konnte deren Fähigkeit zur Phagozytose gesteigert werden.

Somit kann angenommen werden, dass auch in der Klebsiella-Pneumonie applizierte MSCs über die Sezernierung verschiedener löslicher Substanzen wie LL-37, Lipocalin 2 und KGF eine direkt antimikrobielle Wirkung haben, beziehungsweise das innate Immunsystem direkt stimulieren, welches wiederum mitverantwortlich für die Reduktion der Bakterienlast ist.

4.4 Untersuchung des Lungenhomogenats

4.4.1 Auswirkungen der MSC Applikation auf myeloide und lymphatische Zellpopulationen

Betrachtet man den zellulären Einfluss der MSCs auf eine Pneumonie, so fällt zum einen die allgemeine Leukozytose auf, die durch die Gabe von MSCs abgeschwächt wurde. Diese durch die MSC-Applikation verminderte Leukozytose lässt sich durch die Einflüsse der MSCs auf die einzelnen Subpopulationen der Leukozyten erklären und muss differenziert betrachtet werden. Den Fokus auf die myeloiden Subpopulationen

richtend, wurden die Proliferation der Alveolarmakrophagen, der neutrophilen Granulozyten und der dendritischen Zellen sowohl in der Analyse der BAL als auch des Lungenhomogenats gehemmt. Dabei wurden alle analysierten Subpopulationen der dendritischen Zellen durch die Gabe von MSCs signifikant reduziert. Diese suppressive Wirkung von MSCs auf dendritische Zellen ist in der Literatur bereits mehrfach beschrieben (Chiesa et al. 2011; Uccelli et al. 2008) und konnte in der dieser Arbeit zugrunde liegenden Studie bestätigt werden.

Eine Reduktion der Expression von MHCII auf DCs durch MSCs wurde in einem Review von Uccelli et al. beschrieben (Uccelli et al. 2008). Auch die Expression kostimulatorischer Moleküle wie CD86 wird durch die Anwesenheit von MSCs inhibiert (Djouad et al. 2007). DCs mit einem so reduzierten Expressionsprofil von kostimulatorischen Molekülen sind weniger in der Lage T-Zellen zu aktivieren. Folglich hemmen MSCs zusätzlich auf diesem Wege indirekt die Proliferation von T-Zellen (Djouad et al. 2007; Uccelli et al. 2008). Bei der Analyse der Aktivierungsmarker in der subakuten Phase des für diese Dissertation verwendeten Pneumoniemodells waren jedoch keine Unterschiede zwischen den Gruppen von Tieren mit und ohne MSC-Behandlung erkennbar.

Es kam durch die Gabe von MSCs zu einer signifikant schwächeren Proliferation der T-Zellen, wobei besonders CD4⁺ T-Zellen beeinflusst wurden. Wie im ersten Teil dieser Dissertation beschrieben, sind die Hemmung der Proliferation sowie die Reifung von T-Zellen durch die Anwesenheit von MSCs bekannt. Uccelli et al. und Duffy et al. fassten dies in Reviews zusammen (Uccelli et al. 2008; Duffy et al. 2011). Dieser Effekt war auch in dem hier verwendeten Pneumoniemodell signifikant und konnte somit bestätigt werden. Mehrere Studien stellten fest, dass MSCs die Entwicklung von T-Zellen zu regulatorischen T-Zellen fördern, diese am Leben erhalten und in ihrer Zytokinproduktion unterstützen (Di Ianni et al. 2008; Aggarwal et al. 2005; Luz-Crawford et al. 2013). Die gezielte Untersuchung von klassischen regulatorischen T-Zellen (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) im für diese Dissertation verwendeten Pneumoniemodell ergab keine relevante Erhöhung dieses Zellsubtyps durch die Gabe von MSCs. Somit konnten die Ergebnisse anderer Arbeiten zur Auswirkung von MSCs auf regulatorische T-Zellen in diesem Pneumoniemodell nicht bestätigt werden.

4.4.2 Veränderungen der Zytokinproduktion

Bei der intrazellulären Messung verschiedener Zytokine kam es zu signifikanten Unterschieden. Die Produktion von IFN- γ durch CD4⁺ T-Zellen wurde durch die Anwesenheit von MSCs signifikant gehemmt. IFN- γ ist ein stark immunstimulatorisches

Zytokin und wird in besonderem Maße von Th1-Zellen sezerniert, nachdem diese aktiviert wurden. Es dient vor allem der Aktivierung von Makrophagen (Janeway et al. 2009). Des Weiteren wurde durch die Applikation von MSCs die Produktion von Interleukin-17 durch CD4⁺ T-Zellen signifikant gehemmt. IL-17 ist ebenfalls ein proinflammatorisches Zytokin, welches besonders in Zusammenhang mit *Klebsiella pneumoniae* steht. Dieses Interleukin wird hauptsächlich von Th17 Zellen einer Untergruppe der CD4⁺ T-Zellen sezerniert (Tsai et al. 2013; Ye et al. 2001). Wie bereits oben beschrieben, wurde durch die Gabe von MSCs die Proliferation aller untersuchten Subpopulationen der dendritischen Zellen signifikant eingeschränkt, darunter auch die der CD103⁺ DCs. Mehrere Studien legen nahe, dass ein wichtiger Zusammenhang zwischen CD103⁺ DCs und der Aktivierung von T-Zellen besteht und somit auch auf die Produktion von IFN- γ und IL-17 (Ivanov et al. 2012; King et al. 2010).

Eine Erhöhung der Produktion des antiinflammatorischen IL-10, wie sie Aggarwal und Pittenger nachwiesen, konnte in der Studie auf der diese Dissertation basiert nicht beobachtet werden (Aggarwal et al. 2005).

4.5 Vergleich der Auswirkungen von MSCs in der akuten und postakuten Phase der Klebsiella Pneumonie

Im Zuge der biologischen Masterarbeit von Inna Schewschenko „Experimentelle Modulation der akuten bakteriellen Pneumonie und der Differenzierung dendritischer Zellen durch mesenchymale Stammzellen“ wurden die Auswirkungen von MSCs in der akuten Phase 48 Stunden nach Induktion der Pneumonie im gleichen Mausmodell untersucht. Die in dieser Dissertation zum Vergleich beschriebenen Daten der akuten Phase der Pneumonie entstammen der Arbeit von Inna Schewschenko im Rahmen des Tierversuchsantrags „Gram-negative Pneumonie und mesenchymale Stammzellen“.

Im verwendeten Mausmodell ist die Pneumonie in ihrer Akutphase 48 Stunden nach Infektion besonders stark ausgeprägt. Dies ist am Überleben der Mäuse nach 48 Stunden und dem Verlauf anderer klinischer Parameter wie Temperatur- und Gewichtsabnahme ersichtlich. Die Leukozytose ist nach 48 Stunden im Vergleich zur subakuten Phase sehr viel deutlicher ausgeprägt als an Tag fünf. Dies lässt sich durch den massiven Granulozyteneinstrom erklären, der in der subakuten Phase bereits abgeflaut ist. Die Geschwindigkeit mit der die verschiedenen Zelltypen am Entzündungsort eintreffen variiert erheblich. So liegt in den ersten Tagen einer

Pneumonie, in denen die Leukozytose am stärksten ausgeprägt ist, der Schwerpunkt auf den neutrophilen Granulozyten. Monozyten werden erst später mobilisiert und differenzieren sich zu Makrophagen (Janeway et al. 2009). In der subakuten Phase hat sich der Neutrophilenansturm bereits gelegt und die Zellverteilung verschiebt sich zugunsten der Makrophagen und dendritische Zellen, die nun stärker präsent sind (Janeway et al. 2009). Die eingewanderten Granulozyten sind Teil der angeborenen Immunabwehr. Sie dienen in erster Linie der Erstabwehr von Bakterien, welche sie durch Phagozytose aufnehmen oder durch Exozytose ihrer Granula schädigen und zerstören (Janeway et al. 2009). In ihren Granula befinden sich verschiedene antibakterielle Substanzen, wobei Defensine eine besondere Rolle spielen. Nach Phagozytose oder Exozytose gehen die Granulozyten in Apoptose über (Janeway et al. 2009). Dies geschieht vornehmlich in der akuten Phase der Infektion (Janeway et al. 2009). Somit ist der Großteil der neutrophilen Granulozyten in der postakuten Phase bereits im Prozess der Apoptose und steht der Immunreaktion somit nicht mehr zur Verfügung. Da Monozyten später mobilisiert werden, und sich zunächst in Makrophagen differenzieren (Janeway et al. 2009), sind in der subakuten Phase die Makrophagen aktiv. Der Vergleich der Daten bezüglich der akuten und subakuten Phase des verwendeten Pneumoniemodells bestätigt dies. Der Vergleich der dendritischen Subpopulationen zeigte, dass deren Anzahl an Tag fünf stärker ausgeprägt ist. CD103⁺ DCs sind migratorisch (Hackstein et al. 2013), was bedeutet, dass sie nach der Antigenaufnahme zu den Lymphknoten migrieren. Dort hat ihre Antigenpräsentation eine entscheidende Rolle bei der Reifung der T-Zellen (Hackstein et al. 2013). In der akuten Phase der Pneumonie fielen entscheidende Unterschiede in der Expression von Aktivierungsmarkern der dendritischen Zellen auf. So zeigte sich eine signifikante Verminderung der CD86 Expression der CD103⁺ DCs, die in der subakuten Phase nicht mehr nachweisbar war. Diese passt zu der bereits genannten These von Djouad et al., welche die Reduktion der T-Zellaktivierung durch DCs aufgrund der Herunterregulation von kostimulatorischen Oberflächenmarkern darstellt (Djouad et al. 2007).

In der subakuten Phase der Pneumonie ist eine stärkere Lymphozytose erkennbar. Lymphozyten müssen zunächst eine Reifung und Proliferation durchlaufen (Janeway et al. 2009), weshalb ihre Anzahl in der akuten Phase noch geringer ist. Hat die Reifung stattgefunden, ermöglichen sie als Teil des adaptiven Immunsystems eine effektive, auf das aktuelle Pathogen bezogene Immunantwort (Janeway et al. 2009).

Der unter MSC- Gabe weniger starke Anstieg der Proteinkonzentration in der bronchoalveolären Lavage zeigte sich bereits in der akuten Phase der Pneumonie. Es

konnten jedoch keine Unterschiede zwischen der akuten und der subakuten Phase festgestellt werden. Der Gewebeschaden, den die Proteinkonzentration der BAL widerspiegelt geschieht zu Beginn der Infektion und ist auch in der subakuten Phase noch vorhanden. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass dieser nicht innerhalb von fünf Tagen reparabel ist.

4.6 Ausblick

Aufgrund stetiger Resistenzentwicklung (Boucher et al. 2009; Guidos 2011) gewinnen Alternativen zu Antibiotika bei der Therapie von Infektionen immer weiter an Bedeutung. In verschiedenen Studien wurden die Auswirkungen von MSCs auf eine bakterielle Pneumonie mit unterschiedlichen Erregern untersucht (Gupta et al. 2012; Kim et al. 2016). In den Versuchen zu dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass sich die Ergebnisse einer unter MSC Applikation weniger stark ausgeprägten Pneumonie auf eine Klebsiellen Pneumonie übertragen lassen. Bei Klebsiellen handelt es sich, wie bereits erwähnt, um wichtige nosokomiale Erreger (Lee et al. 2015) mit einem oftmals kritischen Profil an Resistenzen (Munoz-Price et al. 2013). Es besteht zum aktuellen Zeitpunkt weiterer Forschungsbedarf bezüglich der Faktoren, welche für die therapeutische Wirkung von MSCs in einer Pneumonie verantwortlich sind. Es wurden von Gupta, Lee, Krasnodembskaya und Kollegen bereits einige Ansätze vorgestellt (Gupta et al. 2012), die es auch in der Klebsiellen Pneumonie zu prüfen gilt. Gerade in Bezug auf die Wirkung von MSCs über Zell- Zell- Kontakte in vivo mangelt es an validen Studien. Die Ergebnisse der Studie zu dieser Arbeit bieten die Möglichkeit zum Wissensstand bezüglich der Rolle der MSCs bei Pneumonien beizutragen und geben Anlass dazu diesen Ansatz weiter zu verfolgen. Ein mögliches Ziel ist die Etablierung der MSC-Therapie bei antibiotikaresistenten Pneumonien im Sinne der evidenzbasierten Medizin.

5 Zusammenfassung

Hintergrund

In zahlreichen Studien wurde das immunmodulatorische Potential von mesenchymalen Stammzellen (MSC) untersucht. Jedoch verwenden die meisten Arbeiten heterogene Stammzellkulturen, was eine starke Einschränkung der Vergleichbarkeit verschiedener Studien zur Folge hat. Für die Versuche dieser Arbeit wurden die MSCs vor der in vitro Expansion prospektiv durch ein definiertes Oberflächenprofil hochrein sortiert. (Reinheit > 95%). Nosokomiale Pneumonien mit antibiotikaresistenten Erregern, wie *Klebsiella pneumoniae* stellen ein zunehmendes medizinisches Problem dar, für das dringend neue therapeutische Alternativen entwickelt werden müssen.

Methoden

Zur Gewinnung von murinen MSCs wurden Humerus, Tibia und Femur von Mäusen präpariert. Definiert durch die Oberflächenmerkmale $PDFGR\alpha^+$ $SCA1^+$ $CD45^-$ $TER119^-$, wurden die MSCs mit einer Reinheit von mindestens 95% von allen anderen Knochenmarkzellen getrennt. In einem Mausmodell wurde eine Klebsiellenpneumonie induziert und vier Stunden nach der Infektion MSCs appliziert. Nach fünf Tagen wurden die Tiere euthanasiert, Organmaterial entnommen und untersucht.

Ergebnisse

Es zeigte sich bei den Mäusen der Gruppe, die nach Infektion MSCs erhielten gegenüber der lediglich infizierten Kontrollgruppe, eine verminderte Bakterienlast und eine signifikante Reduktion des Proteingehalts der bronchoalveolären Lavage. Ferner wurde eine signifikant geringere Leukozytose beobachtet. Alle untersuchten Subpopulationen dendritischer Zellen waren gegenüber der infizierten Kontrollgruppe ohne MSCs Applikation signifikant vermindert. Zudem wurde die lymphozytäre Zytokinproduktion durch die Gabe von MSCs reduziert. Signifikant zeigte sich dies bei der Produktion von IFN- γ durch $CD4^+$ und $CD8^+$ Zellen und der Produktion von IL-17 durch $CD4^+$ Zellen.

Diskussion

Die Ergebnisse lassen auf eine durch die Applikation von MSCs weniger ausgeprägte Entzündungsreaktion schließen. Der reduzierte bronchoalveoläre Proteingehalt lässt Rückschlüsse auf ein geringeres Kapillarleck und somit einen besseren Erhalt der Blutluftschranke zu. Allein durch eine mögliche immunsuppressive Wirkung der MSCs lässt sich die reduzierte Bakterienlast nicht erklären, da ein immunsupprimiertes Milieu

günstigere Bedingungen für ein bakterielles Wachstum darstellt. Neue Studien haben in verschiedenen Ansätzen gezeigt, dass MSCs direkt antibakteriell wirken können. Es kann angenommen werden, dass diese Wirkung auch in dem für diese Dissertation verwendeten Mausmodell zur Reduktion der Bakterienlast beiträgt.

In Bezug auf die Reduktion der Leukozytose, verschiedener Subpopulationen dendritischer Zellen und der Zytokinproduktion von Lymphozyten konnten in der Literatur beschriebene Eigenschaften von MSCs für diese prospektiv sortierte Kultur von MSCs weitestgehend bestätigt werden.

Ausblick

Aufgrund stetiger Resistenzentwicklung gewinnen Alternativen zu Antibiotika bei der Therapie von Infektionen immer weiter an Bedeutung. In verschiedenen Studien wurden die Auswirkungen von MSCs auf eine bakterielle Pneumonie mit unterschiedlichen Erregern untersucht. In den Versuchen zu dieser Dissertation konnte erstmals gezeigt werden, dass sich die Ergebnisse einer unter MSC Applikation weniger stark ausgeprägten Pneumonie auf eine Klebsiellen Pneumonie übertragen lassen. Es besteht zum aktuellen Zeitpunkt weiterer Forschungsbedarf bezüglich der Faktoren, welche für die therapeutische Wirkung von MSCs in einer Pneumonie verantwortlich sind. Ein mögliches Ziel ist die Etablierung der MSC-Therapie bei antibiotikaresistenten Pneumonien im Sinne der evidenzbasierten Medizin.

6 Summary

Background

In numerous studies the immunosuppressive potential of mesenchymal stem cells (MSC) has been analyzed. However, almost all studies use heterogenic cultures of progenitor cells. Therefore the comparability of these studies is strongly limited. For the experiments of this thesis the MSCs were sorted before expansion prospectively on the basis of PDFGR α ⁺ SCA1⁺ CD45⁻ TER119⁻ expression and a culture of over 95% purity was reached. Nosocomial pneumonias with antibiotic resistant bacteria like *Klebsiella pneumoniae* are an increasing medical problem, for which therapeutic alternatives have to be developed.

Methods

To gain MSCs murine humerus, tibia and femur of mice were prepared. On the basis of PDFGR α ⁺ SCA1⁺ CD45⁻ TER119⁻ expression, the MSCs were sorted and cultured with a purity of at least 95%. In a mouse model pneumonia was induced with *Klebsiella pneumoniae*. The MSCs were applied four hours after infection. After five days the mice were killed, organ material was taken and analyzed.

Results

Bacterial load was reduced and the protein content of the BAL was significantly reduced comparing the MSC treated mice to the mock treated control group. Also the leukocytosis was significantly reduced. All examined dendritic cell subsets were significantly reduced compared to the mock treated group. The reduction of lymphocytic cytokine production showed significant results for IFN- γ in CD4⁺ and CD8⁺ cells and IL-17 in CD4⁺ cells.

Conclusion

The results imply a weaker inflammation due to MSC treatment. The reduced protein content in the BAL allows the conclusion that there is a smaller capillary leak which means the integrity of the blood air barrier is impaired less. The reduced bacterial load cannot be explained by the possible immunosuppressive effect of the MSCs. An immunosuppressed milieu would prevail better conditions for bacterial growth. New studies showed that MSCs have a direct antimicrobial effect. This can explain the reduction of bacterial load in this thesis.

The reduction of leukocytosis, the dendritic cell subsets and cytokine production are in literature described as characteristics of MSCs and could be confirmed for this special prospectively sorted population of MSCs.

Future perspective

Due to fast developing resistances alternatives to antibiotic treatments gain more and more importance to face infections. Different studies described the effect of MSC treatment in bacterial pneumonia with varying germs. This study showed for the first time that the results of a less severe pneumonia can be transferred to *Klebsiella* pneumonia. Further research is needed concerning the mechanisms how MSCs effect a pneumonia. One possible goal could be the establishment of MSC therapy in antibiotic-resistant pneumonia in terms of evidence-based medicine.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

AFC	alveolar fluid clearance
ALI	acute lung injury
ARDS	acute respiratory distress syndrome
BAL	bronchoalveoläre Lavage
CAP	community acquired pneumonia
CCL	CC-chemokine ligand
CCR	CC-cytokine receptor
CD	cluster of differentiation
DC	dendritische Zelle
FACS	fluorescence-activated cell sorting
GVHD	graft versus host disease
HAP	hospital acquired pneumonia
HE	Hämatoxylin-Eosin
IFN	Interferon
IL	Interleukin
KGF	keratinocyte growth factor
Kpn	Klebsiella pneumoniae
MACS	magnetic antibody cell sorting
MHC	Major Histocompatibility Complex
MS	Multiple Sklerose
MSC	mesenchymal stem cell
PD	programmed cell death
pDC	plasmacytoid dendritic cell
PDGF	platelet derived growth factor
SCA	Stem cells antigen
SDF	stromal cell-derived factor
SPF	spezifisch pathogenfrei
TCR	T-cell receptor
TLR	toll like receptor

TNF	Tumornekrosefaktor
TRAIL	tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
VAP	ventilator associated pneumonia
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung von murinen MSCs in Zellkultur	3
Abbildung 2: Kultivierung von MSCs.....	3
Abbildung 3: Zellzahlbestimmung mittels Spherotec- Partikeln.....	21
Abbildung 4: Gatingschema der MSC Zellsortierung	23
Abbildung 5: Gatingstrategie zur Identifikation von Granulozyten und Makrophagen in der BAL	25
Abbildung 6: Gatingstrategie zur Identifikation von Granulozyten und Makrophagen in der Lunge.....	27
Abbildung 7: Gatingschema zur Identifikation dendritischer Subpopulationen in der Lunge	28
Abbildung 8: Gatingschema zur Identifikation plasmazytoider dendritischer Zellen. ...	29
Abbildung 9: Gatingschema lymphozytärer Populationen der Lunge.....	30
Abbildung 10: Gatingschema zur Identifikation von regulatorischen T- Lymphozyten. ...	31
Abbildung 11: Gatingschema zur Bestimmung der Vitalität verschiedener Zelltypen ..	33
Abbildung 12: Repräsentative Histogramme der MSC Konsensusmarker	34
Abbildung 13: Bakterienlast in der BAL	35
Abbildung 15: Granulozyten, Makrophagen und dendritische Zellen in der BAL	37
Abbildung 16: absolute Zellzahl im Lungenhomogenat.....	38
Abbildung 17: Granulozyten, Makrophagen und dendritische Zellen im Lungenhomogenat	38
Abbildung 18: Subpopulationen der dendritischen Zellen im Lungenhomogenat	39
Abbildung 19: Repräsentative Punktwolkendiagramme der DC- Subtypen im Lungenhomogenat	40
Abbildung 20: Aktivierungsmarkereexpression der DC- Subtypen.....	41
Abbildung 21: Lymphatische Subpopulationen	42
Abbildung 22: Repräsentative Punktwolkendiagramme der Lymphozytenpopulationen im Lungenhomogenat.....	43
Abbildung 23: regulatorische T-Zellen	44
Abbildung 24: Repräsentative Punktwolkendiagramme der regulatorischen T-Zellen. ...	44
Abbildung 25: Produktion von IFN- γ in CD4+ T-Zellen und CD8+ T-Zellen.....	45
Abbildung 26: Repräsentative Punktwolkendiagramme der Produktion von IFN- γ in CD4+ T-Zellen und CD8+ T-Zellen	45
Abbildung 27: Produktion von IL-4 in CD4+ T-Zellen und CD8+ T-Zellen	46
Abbildung 28: Repräsentative Punktwolkendiagramme der Produktion von IL-4 in CD4+ T-Zellen und CD8+ T-Zellen.....	47
Abbildung 29: Produktion von IL-10 in CD4+ T-Zellen und CD8+ T-Zellen	48
Abbildung 30: Repräsentative Punktwolkendiagramme der Produktion von IL-10 in CD4+ T-Zellen und CD8+ T-Zellen.....	50
Abbildung 31: Produktion von IL-17 in CD4+ T- Zellen und CD8+T- Zellen	50

Abbildung 32: Repräsentative Punktwolkendiagramme der Produktion von IL-17 in CD4+ T-Zellen und CD8+ T-Zellen	51
Abbildung 33: Apoptose Analyse mittels Annexin-V	52
Abbildung 34: repräsentative Bindungsverhalten von Annexin-V an verschiedene Zelltypen	53

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte.....	15
Tabelle 2: Verbrauchsmaterial.....	15
Tabelle 3: Versuchstiere.....	16
Tabelle 4: Antikörper zur FACS- Analyse	16
Tabelle 5: Abkürzungen der Herstellernamen.....	18
Tabelle 6: Mikropartikel für FACS- Kompensation und MACs.....	18
Tabelle 7: Chemikalien, Kulturmedien	18
Tabelle 8 – Antikörper zur FACS Sortierung von MSCs.....	22

7.4 Literaturverzeichnis

- Aggarwal, S.; Pittenger, M. (2005): Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. In: *Blood* 105 (4), S. 1815–1822.
- Ardeshiry, L.; Hagh, M.; Saki, N.; Mortaz, E.; Soleima, M.; Rahim, F. (2013): Feasibility of Cell Therapy in Multiple Sclerosis: A Systematic Review of 83 Studies. In: *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res* 7 (1), S. 15–33.
- Ashkenazi, A.; Pai, R.; Fong, S.; Leung, S.; Lawrence, D.; Marsters, S. et al. (1999): Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. In: *The Journal of clinical investigation* 104 (2), S. 155–162.
- Augello, A.; Tasso, R.; Negrini, Simone M.; Amateis, A.; Indiveri, F.; Cancedda, R.; Pennesi, G. (2005): Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. In: *Eur J Immunol* 35 (5), S. 1482–1490.
- Barry, F. (2003): Biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. In: *Birth Defect Res C* 69 (3), S. 250–256.
- Bartholomew, A.; Sturgeon, C.; Siatskas, M.; Ferrer, K.; McIntosh, K.; Patil, S. et al. (2002): Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. In: *Experimental Hematology* 30 (1), S. 42–48.
- Boucher, H.; Talbot, G.; Bradley, J.; Edwards, J.; Gilbert, D.; Rice, L. et al. (2009): Bad Bugs, No Drugs: No ESKAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America. In: *Clin Infect Dis.* 48 (1), S. 1–12.
- Bruder S. et al. (1994): Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy.
- Bruel, T.; Dupuy, S.; Démoulin, T.; Rogez-Kreuz, C.; Dutrieux, J.; Corneau, A. et al. (2014): Plasmacytoid Dendritic Cell Dynamics Tune Interferon-Alpha Production in SIV-Infected Cynomolgus Macaques. In: *PLoS Pathog* 10 (1), S. e1003915.

- Chiesa, S.; Morbelli, S.; Morando, S.; Massollo, M.; Marini, C.; Bertoni, A. et al. (2011): Mesenchymal stem cells impair in vivo T-cell priming by dendritic cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (42), S. 17384–17389.
- Corcione, A.; Benvenuto, F.; Ferretti, E.; Giunti, D.; Cappiello, V.; Cazzanti, F. et al. (2006): Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. In: *Blood* 107 (1), S. 367–372.
- Darlington, P.; Boivin, M.; Renoux, C.; Francois, M.; Galipeau, J.; Freedman, M. et al. (2010): Reciprocal Th1 and Th17 regulation by mesenchymal stem cells: Implication for multiple sclerosis. In: *Ann Neurol* 68 (4), S. 540–545.
- Dazzi, F.; Krampera, M. (2011): Mesenchymal stem cells and autoimmune diseases. In: *Mesenchymal Stem Cells: Basic and Clinical Aspects* 24 (1), S. 49–57.
- Di Ianni, M.; Del Papa, B.; Ioanni, M.; Moretti, L.; Bonifacio, E.; Cecchini, D. et al. (2008): Mesenchymal cells recruit and regulate T regulatory cells. In: *Experimental Hematology* 36 (3), S. 309–318.
- Di Nicola, M. (2002): Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. In: *Blood* 99 (10), S. 3838–3843.
- Djouad, F.; Charbonnier, L.; Bouffi, C.; Louis-Plence, P.; Bony, C.; Apparailly, F. et al. (2007): Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism. In: *Stem Cells* 25 (8), S. 2025–2032.
- Dominici M. et al. (2006): Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement.
- Dreger, T.; Watson, J.; DVM, W.; Molligan, J.; Achilefu, S.; Schon, L.; Zhang, Z. (2014): Intravenous Application of CD271-selected Mesenchymal Stem Cells during Fracture Healing. In: *Journal of orthopaedic trauma* 28 (0 1), S. S15-19.
- Duffy, M.; Ritter, T.; Ceredig, R.; Griffin, M. (2011): Mesenchymal stem cell effects on T-cell effector pathways. In: *Stem Cell Research & Therapy* 2 (4), S. 34.
- Eisner, M.; Thompson, T.; Hudson, L.; Luce, J.; Hayden, D.; Schoenfeld, D.; Matthay, M. (2001): Efficacy of low tidal volume ventilation in patients with different clinical risk factors for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. In: *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 164 (2), S. 231–236.
- Eljaafari, A.; Tartelin, M.; Aissaoui, Hanaa; C., Guillaume; O., Bilal; L., Fabien; M. (2012): Bone marrow-derived and synovium-derived mesenchymal cells promote Th17 cell expansion and activation through caspase 1 activation: contribution to the chronicity of rheumatoid arthritis. In: *Arthritis Rheum.* 64 (7), S. 2147–2157.
- El-Jawhari, J.; El-Sherbiny, Y.; Jones, E.; McGonagle, D. (2014): Mesenchymal stem cells, autoimmunity and rheumatoid arthritis. In: *QJM*.
- Ganten, D.; Ruckpaul, K. (2008): Grundlagen der Molekularen Medizin: Springer Berlin Heidelberg. S. 425-448.

- Gao, X.; Usas, A.; Tang, Y.; Lu, A.; Tan, J.; Schneppendahl, J. et al. (2014): A comparison of bone regeneration with human mesenchymal stem cells and muscle-derived stem cells and the critical role of BMP. In: *Biomaterials* 35 (25), S. 6859–6870.
- Ghannam, S.; Pene, J.; Moquet-Torcy, G.; Jorgensen, C.; Yssel, H. (2010): Mesenchymal stem cells inhibit human Th17 cell differentiation and function and induce a T regulatory cell phenotype. In: *J Immunol* 185 (1), S. 302–312.
- Gianhecchi, E.; Delfino, D.; Fierabracci, A. (2013): Recent insights into the role of the PD-1/PD-L1 pathway in immunological tolerance and autoimmunity. In: *Autoimmun Rev* 12 (11), S. 1091–1100.
- Guidos, R. (2011): Combating Antimicrobial Resistance: Policy Recommendations to Save Lives. In: *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 52 (Suppl 5), S. S397-428.
- Gupta, N.; Krasnodembskaya, A.; Kapetanaki, M.; Mouded, M.; Tan, X.; Serikov, V.; Matthay, M. (2012): Mesenchymal stem cells enhance survival and bacterial clearance in murine *Escherichia coli* pneumonia. In: *Thorax* 67 (6), S. 533–539.
- Gupta, N.; Su, X.; Popov, B.; Lee, J. W.; Serikov, V.; Matthay, M. (2007): Intrapulmonary delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves survival and attenuates endotoxin-induced acute lung injury in mice. In: *Journal of immunology* 179 (3), S. 1855–1863.
- Hackstein, H.; Lippitsch, A.; Krug, P.; Schevtschenko, I.; Kranz, S.; Hecker, M. et al. (2015): Prospectively defined murine mesenchymal stem cells inhibit *Klebsiella pneumoniae*-induced acute lung injury and improve pneumonia survival. In: *Respiratory Research* 16, S. 123.
- Hackstein, H.; Kranz, S.; Lippitsch, A.; Wachtendorf, A.; Kershaw, O.; Gruber, A. et al. (2013): Modulation of respiratory dendritic cells during *Klebsiella pneumoniae* infection. In: *Respir Res* 14 (1), S. 91.
- Hare, J.; Traverse, J.; Henry, T.; Dib, N.; Strumpf, R.; Schulman, S. et al. (2009): A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Dose-Escalation Study of Intravenous Adult Human Mesenchymal Stem Cells (Prochymal) After Acute Myocardial Infarction. In: *Journal of the American College of Cardiology* 54 (24), S. 2277–2286.
- Hof, H.; Dörries, R. et al. (2014): Duale Reihe - Medizinische Mikrobiologie. 5. Auflage S. 409
- Herold, G. et al. (2011): Innere Medizin. S. 361-375
- Ho, A.; Prabhu, Nayana; B., Richard J.; Ge, M.; Dai, Xilei; H., Paul, E. et al. (2011): Lung CD103+ dendritic cells efficiently transport influenza virus to the lymph node and load viral antigen onto MHC class I for presentation to CD8 T cells. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 187 (11), S. 6011–6021.
- Hoffbrand, A.V (2003): Grundkurs Hämatologie: Blackwell-Verlag. (2. Auflage) S. 2-10
- Igura, K.; Zhang, X.; Takahashi, K.; Mitsuru, A.; Yamaguchi, S.; Takashi, T. (2004): Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta. In: *Cytotherapy* 6 (6), S. 543–553.

- Ivanov, S.; Fontaine, J.; Paget, C.; Fernandez, E.; van Maele, L.; Renneson, J. et al. (2012): Key Role for Respiratory CD103+ Dendritic Cells, IFN- γ , and IL-17 in Protection Against *Streptococcus pneumoniae* Infection in Response to α -Galactosylceramide. In: *J Infect Dis*. 206 (5), S. 723–734.
- Murphy K., Travers P., Walport M. (2009): Janeway Immunologie. 7. Aufl. Heidelberg: Spektrum, Akad. Verl.
- Kim, J.; Cha, S.; Kim, W.; Han, S.; Cha, S.; Kim, H. et al. (2016): A Novel Therapeutic Approach Using Mesenchymal Stem Cells to Protect Against *Mycobacterium abscessus*. In: *Stem Cells*.
- Kim, T.; Braciale, T.; Unutmaz, D. (2009): Respiratory Dendritic Cell Subsets Differ in Their Capacity to Support the Induction of Virus-Specific Cytotoxic CD8+ T Cell Responses. In: *PLoS ONE* 4 (1),
- King, I.; Kroenke, M.; Segal, B. (2010): GM-CSF–dependent, CD103+ dermal dendritic cells play a critical role in Th effector cell differentiation after subcutaneous immunization. In: *The Journal of Experimental Medicine* 207 (5), S. 953–961.
- Krampera, M.; Galipeau, J.; Shi, Y.; Tarte, K.; Sensebe, L. (2013): Immunological characterization of multipotent mesenchymal stromal cells—The International Society for Cellular Therapy (ISCT) working proposal. In: *Cytotherapy* 15 (9), S. 1054–1061.
- Krasnodembskaya, A.; Song, Y.; Fang, X.; Gupta, N.; Serikov, V.; Lee, J.; Matthay, M. (2010): Antibacterial effect of human mesenchymal stem cells is mediated in part from secretion of the antimicrobial peptide LL-37. In: *Stem Cells* 28 (12), S. 2229–2238.
- Lama, V.; Smith, L.; Badri, L.; Flint, A.; Andrei, A.; Murray, S. et al. (2007): Evidence for tissue-resident mesenchymal stem cells in human adult lung from studies of transplanted allografts. In: *The Journal of clinical investigation* 117 (4), S. 989–996.
- Lande, R.; Gilliet, M. (2010): Plasmacytoid dendritic cells: key players in the initiation and regulation of immune responses. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1183 (1), S. 89–103.
- Le Nouën, C.; Hillyer, P.; Winter, C.; McCarty, T.; Rabin, R.; Collins, P. et al. (2011): Low CCR7-Mediated Migration of Human Monocyte Derived Dendritic Cells in Response to Human Respiratory Syncytial Virus and Human Metapneumovirus. In: *PLoS Pathog* 7 (6),
- Lee, J.; Fang, X.; Gupta, N.; Serikov, V.; Matthay, M. (2009): Allogeneic human mesenchymal stem cells for treatment of *E. coli* endotoxin-induced acute lung injury in the ex vivo perfused human lung. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (38), S. 16357–16362.
- Lee, J.; Krasnodembskaya, A.; McKenna, D.; Song, Y.; Abbott, J.; Matthay, M. (2013): Therapeutic Effects of Human Mesenchymal Stem Cells in Ex Vivo Human Lungs Injured with Live Bacteria. In: *Am J Respir Crit Care Med* 187 (7), S. 751–760.
- Lee, W.; Choi, H.; Hong, S.; Kim, K.; Ghoo, Y.; Jeon, S. (2015): Vaccination with *Klebsiella pneumoniae*-derived extracellular vesicles protects against bacteria-induced lethality via both humoral and cellular immunity. In: *Experimental & Molecular Medicine* 47 (9),

- Li, Z.; Wang, C.; Lu, G.; Pan, X.; Xu, K. (2014): Effects of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells on Hematopoietic Recovery and Acute Graft-Versus-Host Disease in Murine Allogeneic Umbilical Cord Blood Transplantation Model. In: *Cell Biochem Biophys*.
- Lobsien, D.; Dreyer, A.; Stroh, A.; Boltze, J.; Hoffmann, K.; Fraidenraich, D. (2013): Imaging of VSOP Labeled Stem Cells in Agarose Phantoms with Susceptibility Weighted and T2* Weighted MR Imaging at 3T: Determination of the Detection Limit. In: *PLoS ONE* 8 (5)
- Loebinger, M.; Eddaoudi, A.; Davies, D.; Janes, S. (2009a): Mesenchymal Stem Cell Delivery of TRAIL Can Eliminate Metastatic Cancer. In: *Cancer Research* 69 (10), S. 4134–4142.
- Loebinger, M.; Kyrtatos, P.; Turmaine, M.; Price, A.; Pankhurst, Q.; Lythgoe, M.; Janes, S. (2009b): Magnetic Resonance Imaging of Mesenchymal Stem Cells Homing to Pulmonary Metastases Using Biocompatible Magnetic Nanoparticles. In: *Cancer Research* 69 (23), S. 8862–8867.
- Longo, Fauci, Kasper, Hauser, Jameson, Loscalzo (Hg.) (2012): *Harrisons - Innere Medizin*. ABW Wissenschaftsverlag G 18. Auflage Band 2. Kapitel Pneumologie.
- López-García, B.; Lee, P.; Yamasaki, K.; Gallo, R. (2005): Anti-fungal activity of cathelicidins and their potential role in *Candida albicans* skin infection. In: *J. Invest. Dermatol.* 125 (1), S. 108–115.
- Lucas, R.; Verin, A.; Black, S.; Catravas, J. (2009): Regulators of endothelial and epithelial barrier integrity and function in acute lung injury. In: *Biochem Pharmacol* 77 (12), S. 1763–1772.
- Luz-Crawford, P.; Kurte, M.; Bravo-Alegría, J.; Contreras, R.; Nova-Lamperti, E.; Tejedor, G. et al. (2013): Mesenchymal stem cells generate a CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cell population during the differentiation process of Th1 and Th17 cells. In: *Stem Cell Research & Therapy* 4 (3), S. 65.
- Luz-Crawford, P.; Noël, D.; Fernandez, X.; Khoury, M.; Figueroa, F.; Carrión, F. et al. (2012): Mesenchymal Stem Cells Repress Th17 Molecular Program through the PD-1 Pathway. In: *PLoS ONE* 7 (9).
- Mabuchi, Y.; Houlihan, D.; Akazawa, C.; Okano, H.; Matsuzaki, Y. (2013): Prospective isolation of murine and human bone marrow mesenchymal stem cells based on surface markers. In: *Stem cells international* 2013, S. 507301.
- Marquez-Curtis, L.; Janowska-Wieczorek, A. (2013): Enhancing the Migration Ability of Mesenchymal Stromal Cells by Targeting the SDF-1/CXCR4 Axis. In: *BioMed Research International* 2013 (5), S. 1–15.
- Martin, M. U.; Resch, K. (2009): *Immunologie UTB Basics* UlmerVerlag 1.Auflage
- Meisel, R.; Zibert, A.; Laryea, M.; Göbel, U.; Däubener, W.; Dilloo, D. (2004): Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. In: *Blood* 103 (12), S. 4619–4621.

- Michael, M.; Shimoni, A.; Nagler, A. (2013): Recent compounds for immunosuppression and experimental therapies for acute graft-versus-host disease. In: *Isr Med Assoc J* 15 (1), S. 44–50.
- Mizgerd, J.; Skerrett, S. (2008): Animal models of human pneumonia. In: *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* 294 (3), S. L387–L398.
- Morikawa, S.; Mabuchi, Y.; Kubota, Y.; Nagai, Y.; Niibe, K.; Hiratsu, E. et al. (2009): Prospective identification, isolation, and systemic transplantation of multipotent mesenchymal stem cells in murine bone marrow. In: *Journal of Experimental Medicine* 206 (11), S. 2483–2496.
- Mu, D.; Zhang, X.; Xie, J.; Yuan, H.; Wang, K.; Huang, W. et al. (2016): Intracoronary Transplantation of Mesenchymal Stem Cells with Overexpressed Integrin-Linked Kinase Improves Cardiac Function in Porcine Myocardial Infarction. In: *Scientific Reports* 6, S. 19155.
- Mukherjee, S.; Maiti, P.; Nandi, D. (2002): Role of CD80, CD86, and CTLA4 on mouse CD4(+) T lymphocytes in enhancing cell-cycle progression and survival after activation with PMA and ionomycin. In: *J Leukoc Biol* 72 (5), S. 921–931.
- Muñiz, C.; Teodosio, C.; Mayado, A.; Amaral, A.; Matarraz, Sergio; Bárcena, Paloma et al. (2015): Ex vivo identification and characterization of a population of CD13 high CD105 + CD45 – mesenchymal stem cells in human bone marrow. In: *Stem Cell Research & Therapy* 6 (1), S. 169.
- Munoz-Price, L.; Poirel, L.; Bonomo, R.; Schwaber, M.; Daikos, G.; Cormican, M. et al. (2013): Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. In: *The Lancet Infectious Diseases* 13 (9), S. 785–796.
- Murphy, J.; Dixon, K.; Beck, S.; Fabian, D.; Feldman, A.; Barry, F. (2002): Reduced chondrogenic and adipogenic activity of mesenchymal stem cells from patients with advanced osteoarthritis. In: *Arthritis & Rheumatism* 46 (3), S. 704–713.
- Najar, M.; Rouas, R.; Raicevic, G.; Boufker, H.; Lewalle, P.; Meuleman, N. et al. (2009): Mesenchymal stromal cells promote or suppress the proliferation of T lymphocytes from cord blood and peripheral blood: the importance of low cell ratio and role of interleukin-6. In: *Cytotherapy* 11 (5), S. 570–583.
- Narbona-Carceles, J.; Vaquero, J.; Suarez-Sancho, S.; Forriol, F.; Fernandez-Santos, M. (2014): Bone marrow mesenchymal stem cell aspirates from alternative sources: is the knee as good as the iliac crest? In: *Injury* 45 Suppl 4, S. S42-7.
- Neyt, K.; Lambrecht, B. (2013): The role of lung dendritic cell subsets in immunity to respiratory viruses. In: *Immunol Rev* 255 (1), S. 57–67.
- Podschun, R.; Ullmann, U. (1998): *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. In: *Clin Microbiol Rev* 11 (4), S. 589–603.
- Polchert, D.; Sobinsky, J.; Douglas, G.; Kidd, M.; Moadsiri, A.; Reina, E. et al. (2008): IFN-gamma activation of mesenchymal stem cells for treatment and prevention of graft versus host disease. In: *Eur. J. Immunol.* 38 (6), S. 1745–1755.

- Prevosto, C.; Zancolli, M.; Canevali, P.; Zocchi, M.; Poggi, A. (2007): Generation of CD4⁺ or CD8⁺ regulatory T cells upon mesenchymal stem cell-lymphocyte interaction. In: *Haematologica* 92 (7), S. 881–888.
- Ratjen, F.; Havers, W.; Braun, J. (1999): Intrapulmonary protein leakage in immunocompromised children and adults with pneumonia. In: *Thorax* 54 (5), S. 432–436.
- Rojas, M.; Xu, J.; Woods, C.; Mora, A.; Spears, W.; Roman, J.; Brigham, K. (2005): Bone marrow-derived mesenchymal stem cells in repair of the injured lung. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* 33 (2), S. 145–152.
- S3 Leitlinie - Nosokomiale Pneumonie - Epidemiologie, Diagnostik und Therapie erwachsener Patienten (2012).
- S3 Leitlinie - Tiefe Atemwegsinfektion und Pneumonie bei Erwachsenen, ambulant erworben: Epidemiologie, Diagnostik, antimikrobielle Therapie, Management (2009).
- Sensebé, L.; Gadelorge, M.; Fleury-Cappellesso, S. (2013): Production of mesenchymal stromal/stem cells according to good manufacturing practices: a review. In: *Stem Cell Res Ther* 4 (3), S. 66.
- Smeianov, V.; Scott, K.; Reid, G. (2000): Activity of cecropin P1 and FA-LL-37 against urogenital microflora. In: *Microbes Infect* 2 (7), S. 773–777.
- Spellberg, B. (2014): The future of antibiotics. In: *Critical Care* 18 (3), S. 228.
- Tsai, H.; Velichko, S.; Hung, L.; Wu, R. (2013): IL-17A and Th17 cells in lung inflammation: an update on the role of Th17 cell differentiation and IL-17R signaling in host defense against infection. In: *Clin. Dev. Immunol.* 2013, S. 267971.
- Uccelli, A.; Moretta, L.; Pistoia, V. (2008): Mesenchymal stem cells in health and disease. In: *Nat Rev Immunol* 8 (9), S. 726–736.
- Wada, N.; Gronthos, S.; Bartold, P. (2013): Immunomodulatory effects of stem cells. In: *Periodontol.* 2000 63 (1), S. 198–216.
- Ware, L.; Matthay, M. (2000): The Acute Respiratory Distress Syndrome. In: *N Engl J Med* 342 (18), S. 1334–1349.
- Waterman, R.; Tomchuck, S.; Henkle, S.; Betancourt, A. (2010): A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 phenotype. In: *PLoS ONE* 5 (4), S. e10088.
- Wlodkowic, D.; Skommer, J.; Darzynkiewicz, Z. (2012): cytometry of apoptosis. Historical perspective and new advances. In: *Experimental oncology* 34 (3), S. 255–262.
- Wolf, D.; Lilienfeld-Toal, M.; Wolf, A.; Schleuning, M.; Bergwelt-Baildon, M.; Held, S.; Brossart, P. (2012): Novel treatment concepts for graft-versus-host disease. In: *Blood* 119 (1), S. 16–25.
- Ye, P.; Garvey, P.; Zhang, P.; Nelson, S.; Bagby, G.; Summer, W. et al. (2001): Interleukin-17 and lung host defense against *Klebsiella pneumoniae* infection. In: *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 25 (3), S. 335–340.

Zhou, Y.; Day, A.; Haykal, S.; Keating, A.; Waddell, T. (2013): Mesenchymal stromal cells augment CD4+ and CD8+ T-cell proliferation through a CCL2 pathway. In: *Cytotherapy* 15 (10), S. 1195–1207.

Zuk, P.; Zhu, M.; Mizuno, H.; Huang, J.; Futrell, J.; Katz, A. et al. (2001): Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. In: *Tissue engineering* 7 (2), S. 211–228.

8 Publikationen

Hackstein, H.; Lippitsch, A.; Krug, P.; Schevtschenko, I.; Kranz, S.; Hecker, M. et al. (2015): Prospectively defined murine mesenchymal stem cells inhibit *Klebsiella pneumoniae*-induced acute lung injury and improve pneumonia survival. In: *Respiratory Research* 16, S. 123.

9 Danksagung

Ich möchte allen danken, die an der Entstehung dieser Promotionsarbeit beteiligt waren. Ich danke Herrn Prof. Dr. Gregor Bein, sowie Prof. Dr. Holger Hackstein für die Ermöglichung der Durchführung dieser Promotion. Zu großem Dank bin ich Frau Dr. Nelli Baal und Herrn Prof. Dr. Holger Hackstein für die Betreuung und kontinuierliche Unterstützung während der Entstehung dieser Arbeit verbunden. Danke auch für die vielfältigen Ratschläge, die Erläuterung der spezifischen Zusammenhänge und die Korrektur der Dissertation.

Zudem möchte ich Frau Anne Lippitsch, Frau Gabriela Michels, Herrn Andreas Wachtendorf und allen weiteren beteiligten Mitarbeitern des Zentrums für Transfusionsmedizin und Hämotherapie für die große Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der Versuche für diese Dissertation danken.

Ferner möchte ich allen Beteiligten der SFB Transregio 84 (Project B3 (HH), University Gießen and Marburg Lung Center (UGMLC), Excellence Cluster Cardiopulmonary System (ECCPS) danken.

Mein großer Dank geht außerdem an Larissa Schäfer, meine Mutter Ulrike Krug-Gravert und meinen Vater Axel Krug für die Lektorentätigkeit.

Großer Dank gebührt meiner Familie, für die uneingeschränkte Unterstützung und den Rückhalt, den ich immer bekommen habe, für die Ermöglichung meines Studium und dieser Promotionsarbeit.

10 Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Philipp Krug